

UNIVERSIDAD DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS DOCTORAL

Potasio, calcio y magnesio como elementos antibacterianos
"in vivo"

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Marina Platero Sanz

Madrid, 2015



577.1
PLA

Universidad de Madrid

Facultad de Ciencias



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
BIBLIOTECA

POTASIO, CALCIO Y MAGNESIO COMO ELEMENTOS

ANTIBACTERIANOS "IN VIVO"

Marina Platero

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE - MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
BIBLIOTECA
Nº Registro ...34017.....

TESIS presentada para
optar al grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
por

MARINA PLATERO SANZ

b24981564
137378491

Madrid - 1974

Deseo expresar mi agradecimiento a la Dr. G. Tejerina Domínguez quien con su experiencia y conocimiento, ha asumido la dirección de esta tesis.

El trabajo experimental de la misma se ha llevado a cabo en el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología, a cuyo Director, Prof. L. Vilas López, agradezco las facilidades dadas para su realización.

De igual forma, agradezco también al Prof. D. Fernandes Galia no su amabilidad accediendo a la ponencia de esta tesis.

Quiero resaltar la labor de los Servicios Generales del C.I.B. y del Departamento de Fertilidad de Suelos y Nutrición Vegetal del Instituto de Edafología y Biología Vegetal, especialmente a las Dras. P. Sánchez Conde y R. de Felipe, cuya eficaz colaboración nos ha sido de gran ayuda.

Asimismo quiero agradecer los amables consejos de la Dra. E. Cabezas de Herrera y el apoyo de mis compañeros y auxiliares de laboratorio, así como el de todas aquellas personas que de una u otra forma han contribuido a la consecución de este trabajo.

Esta tesis se ha realizado gracias a una ayuda del "Plan de Formación de Personal Investigador" del Ministerio de Educación y Ciencia.

I N D I C E

I. INTRODUCCION

A. <u>JUSTIFICACION DEL TEMA</u>	1
B. <u>NUTRICION VEGETAL</u>	3
a) Referencias sobre potasio	4
b) " " calcio	6
c) " " magnesio	7
C. <u>PLANTA COMO HABITAT DE BACTERIAS PATOGENAS</u> . .	9
D) <u>ENFERMEDADES PARENQUIMATOSAS OBSERVADAS EN LAS PLANTAS Y SUS CARACTERISTICAS,</u>	9
E) <u>BACTERIAS CAUSANTES DE PODREDUMBRES Y ABLANDAMIENTOS EN TEJIDOS VEGETALES: ERWINIA CAROTOVORA</u>	12
F) <u>NUTRICION INORGANICA BACTERIANA</u>	15
G) <u>SINTESIS DE ENZIMAS PECTOLITICAS</u>	17
a) PG	17
b) PATE	17
c) PTE	17
d) PE	17
H) <u>PLANTEAMIENTO DEL TEMA</u>	19

II. MATERIAL Y METODOS

A. <u>MICROORGANISMO PATOGENO</u>	21
1. Procedencia y conservaci3n	21
2. Medios de cultivo	22

	<u>Páginas</u>
3. Condiciones de incubación	24
4. Representación de crecimiento	25
5. Microscopía	25
6. Síntesis y valoración de poligalacturamasa (PG)	26
7. Síntesis y valoración de ácido-péctico-transeliminasa (PATE)	29
8. Síntesis y valoración de pectín-transeliminasa (PTE)	30
B. <u>PLANTA HUESPED</u>	31
1. Elección: <u>Phaseolus vulgaris L.</u>	31
2. Tratamiento de semillas	31
3. Siembra en macetas	31
4. Solución nutritiva	32
5. Planteamiento general del ensayo	34
a) Tratamiento de potasio	35
b) " calcio	36
c) " magnesio	36
6. Técnica de inoculación	37
7. Técnicas histológicas	37
a) Tratamiento previo	37
i) Fijación	38
ii) Deshidratación	38
iii) Infiltración en parafina	38

	<u>Páginas</u>
b) Obtención de cortes	39
c) Tinción, montaje y observación	40
8. Análisis físicoquímico del tejido vegetal . . .	41
a) Determinación de humedad	41
b) Determinación de pH	42
c) Determinación de iones	42
i) Potasio	42
ii) Calcio	43
iii) Magnesio	44
d) Extracción de azúcares y aminoácidos	44
i) Análisis de azúcares	45
- Cromatografía en papel	45
" " capa fina	46
ii) Análisis de aminoácidos	47
- Cromatografía en papel.	47
" " capa fina	48
- Analizador de aminoácidos	49
e) Extracción de sustancias reductoras y sustan- cias de naturaleza péctica	51
i) Valoración de grupos reductores	52
ii) Valoración de sustancias pécticas	53

f) Extracción de proteínas y nitrógeno libre . . .	53
1) Determinación de proteína	55
11) " " nitrógeno libre	56
9. Análisis enzimático del tejido vegetal	56
a) Extracción de material activo.	56
1) Determinación de PG	57
11) " " PATE y PTE	57

III. RESULTADOS

A. <u>OBSERVACION MICROSCOPIA SOBRE LA MORFOLOGIA DEL MICRO-ORGANISMO PATOGENO ERWINIA CAROTOVORA, Y SOBRE LA HISTOLOGIA DE LA PLANTA HUERFED PHASEOLUS VILGARIS L.</u>	59
a) Morfología de Erwinia carotovora.	59
1. Influencia del NO_3K , $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ y SO_4Mg	60
b) Histología de Phaseolus vulgaris L.	62
1. Grado de humedad t pH	62
2. Diferenciación al microscopio	63
B. <u>INFLUENCIA DEL ION K^+ SOBRE EL MICROORGANISMO PATOGENO ERWINIA CAROTOVORA</u>	66
a) Crecimiento	66
b) Síntesis de enzimas pectolíticas	66
1. Producción de poligalacturonasa (PG)	66
2. " " pectatranseliminasa (PATE)	66
3. " " pectintranseliminada (PTE)	67

C. INFLUENCIA DEL ION K^+ SOBRE LA PLANTA HUESPED	
<u>RYABEDUS VULGARIS L.</u>	72
a) Crecimiento	72
b) Sensibilidad a la infección	72
c) Absorción de potasio, calcio y magnesio	73
d) Contenido en compuestos orgánicos	75
1. Azúcares libres	75
2. Sustancias reductoras	76
3. Sustancias pécticas	79
4. Aminoácidos libres	79
5. Nitrógeno total	89
6. Proteínas	89
e) Síntesis de enzimas pectolíticas	92
1. Poligalacturonasa	92
2. Pectatranseliminasa	92
3. Pectintranseliminasa	92
D. INFLUENCIA DEL ION Ca^{++} SOBRE EL MICROORGANISMO PATO-	
<u>GENO EPIDERMIA CAROTOPORA</u>	96
a) Crecimiento	96
b) Síntesis de enzimas pectolíticas	98
1. Producción de poligalacturonasa	98
2. " " pectatranseliminasa	98
3. " " pectintranseliminasa	98

E. INFLUENCIA DEL ION Ca^{++} SOBRE LA PLANTA HUESPED	
<u>PHASEOLUS VULGARIS L.</u>	102
a) Crecimiento	102
b) Sensibilidad a la infección	102
c) Absorción de potasio, calcio y magnesio	104
d) Contenido en compuestos orgánicos	104
1. Azúcares libres	104
2. Sustancias reductoras	105
3. " pectícas	106
4. Aminoácidos libres	109
5. Nitrógeno total	117
6. Proteínas	120
e) Síntesis de enzimas pectolíticas	120
1. Poligalacturonasa	120
2. Pectatotranseliminasa	122
3. Pectintranseliminasa	122
F. INFLUENCIA DEL ION Mg^{++} SOBRE EL MICROORGANISMO PATOGENO	
<u>ERWINIA CAROTOVORA</u>	125
a) Crecimiento	125
b) Síntesis de enzimas pectolíticas	125
1. Producción de poligalacturonasa	127
2. " " pectatotranseliminasa	127
3. " " pectintranseliminasa	127

G. INFLUENCIA DEL ION Mg^{++} SOBRE LA PLANTA HUESPED <u>PHASEOLUS VULGARIS L.</u>	131
a) Crecimiento	131
b) Sensibilidad a la infección	131
c) Absorción de potasio, calcio y magnesio	132
d) Contenido en compuestos orgánicos	132
1. Azúcares libres	132
2. Sustancias reductoras	134
3. " pécticas	134
4. Aminoácidos libres	137
5. Nitrógeno total	145
6. Proteínas	145
e) Síntesis de enzimas pectolíticas	148
1. Poligalacturonasa	148
2. Pectatotranseliminasa	148
3. Pectintranseliminasa	152

IV. DISCUSION

A. ALTERACIONES EN EL PATOGENO ERWINIA CAROTOVORA PRODUCIDAS POR LA PRESENCIA, EN DISTINTOS NIVELES, DE NO_3K , $(NO_3)_2 Ca$ y SO_4Mg <u>EN EL MEDIO DE CULTIVO</u>	153
a) Multiplicación celular.	154
b) Morfología	155
c) Síntesis enzimática	156

1. Poligalacturonasa	157
2. Pectatotranseliminasa	158
3. Pectintranseliminasa	159
B. RESPUESTA DE PHASEOLUS VULGARIS L. EN RELACION A MODIFICACIONES EN SU MEDIO DE CRECIMIENTO, INFLUENCIA DEL $\text{NO}_3\text{-K}$	161
a) Sensibilidad a la infección por <i>Erwinia carotovora</i> . . .	162
b) Absorción de potasio, calcio y magnesio	164
c) Contenido en compuestos carbonados	166
d) Contenido en compuestos nitrogenados	168
e) Presencia de enzimas pécticas	172
C. RESPUESTA DE PHASEOLUS VULGARIS L. EN RELACION A MODIFICACIONES EN SU MEDIO DE CRECIMIENTO, INFLUENCIA DEL $(\text{NO}_3)_2\text{-Ca}$	175
a) Sensibilidad a la infección por <i>Erwinia carotovora</i> . . .	176
b) Absorción de potasio, calcio y magnesio	177
c) Contenido en compuestos carbonados	177
d) Contenido en compuestos nitrogenados	180
e) Presencia de enzimas pécticas	184
D. RESPUESTA DE PHASEOLUS VULGARIS L. EN RELACION A MODIFICACIONES EN SU MEDIO DE CRECIMIENTO, INFLUENCIA DEL $\text{SO}_4\text{-Mg}$	188
a) Sensibilidad a la infección por <i>Erwinia carotovora</i>	188
b) Absorción de potasio, calcio y magnesio	189
c) Contenido en compuestos carbonados	190
d) Contenido en compuestos nitrogenados	191

e) Presencia de enzimas pécticas	193
V. CONSIDERACIONES	197
<u>VI. CONCLUSIONES</u>	203
VII. RESUMEN	208
VIII. BIBLIOGRAFIA	219

I. INTRODUCCION

I - INTRODUCCION

A. - JUSTIFICACION DEL TEMA

Desde que en 1883 Burrill (20) en Illinois y Wakker (137) en Amsterdam dejaron bien sentado que las bacterias podian causar enfermedades en plantas, se ha venido estudiando incesantemente el papel de estos micro organismos en las enfermedades vegetales, intentando con ello igualar en conocimientos a cuanto es sabido acerca de fitoinfecciones por hongos, problema éste que fué aceptado 200 años antes de que se admitiese la existencia de bacterias fitopatógenas y que ha evolucionado con notable rapidez.

La primera condición para que se inicie un proceso infectivo en el vegetal, es que se produzca el encuentro del agente patógeno con su posible huesped. Transcurrido este momento se inicia un periodo de incubación durante el cual el parásito intenta proliferar y avanzar a través de

.../

los tejidos vegetales; para que esto ocurra es preciso que el microorganismo sea capaz de sobrevivir utilizando los medios que el sustrato vegetal le proporcione, lo que entraña una serie de procesos bioquímicos y fisiológicos que conducen a muy notables alteraciones morfológicas, responsables de lesiones perfectamente visibles que permiten diagnosticar la enfermedad.

No en todos los casos en que hay un contacto entre huésped y parásito puede hablarse de enfermedad vegetal, ya que para ello han de coincidir una serie de factores tanto por parte del huésped como del microorganismo fitopatógeno.

De lo que no hay duda es de que la presencia de nutrientes para el patógeno es condición esencial para su evolución y que estos nutrientes han de estar representados en los tejidos de la planta atacada. Ahora bien, la composición de los tejidos vegetales no es definida y estática por depender de muy diversas circunstancias, entre las que hemos de resaltar la fertilidad del suelo en el que la planta se localiza. Luego, en definitiva podemos admitir una interacción, con múltiples dependencias, entre la fertilidad de suelos, la nutrición vegetal y el establecimiento de parásitos en sus respectivos huéspedes.

En el presente trabajo se estudia la influencia de la nutrición vegetal a través de distintos aditivos inorgánicos, en el resultado de la lucha planta/bacteria.

B. - NUTRICION VEGETAL

El crecimiento y desarrollo de una planta y más específicamente la diferenciación de sus células y la evolución de sus procesos fisiológicos y energéticos, están vinculadas a las disponibilidades para su nutrición.

Durante algún tiempo se otorgó a la materia orgánica existente en el suelo y a la fabricada por la misma planta, como consecuencia de la fotosíntesis, el papel principal, y casi único, dentro de la nutrición vegetal. Pero pronto hubo que admitir la necesidad de una nutrición inorgánica basada en la absorción de los elementos asimilables, que la planta ha de tomar de su propio habitat. Enseguida vino la distinción entre elementos esenciales, semiesenciales y no esenciales, así como de macronutrientes y micronutrientes.

Una consideración fundamental, de aceptación unánime se refiere al carácter de cooperación de todos los factores de desarrollo, de forma que uno solo de ellos no es suficiente para aclarar los misterios del metabolismo. Por otra parte, la acción específica de un nutriente, de acuerdo con su función, es diferente. Al establecerse la ley del mínimo de Liebig, quedó marcada la interrelación de factores nutritivos y se introdujo el concepto de factor limitante, aunque como tal factor limitante, en el metabolismo vegetal, no actúa un elemento aislado, sino que se entrecruza la acción de varios de ellos, pudiendo ocasionar interacciones positivas o negativas.

.../

La justificación de Russell (106) y las gráficas que propone para interpretar el papel de los distintos elementos en la nutrición vegetal, constituyen un gran apoyo para la comprensión de los principales fundamentos de las teorías nutritivas.

Nuestro estudio sobre nutrición vegetal hemos decidido centrarlo en tres elementos esenciales para el desarrollo de la planta, que además pueden ejercer una función general bastante similar entre sí. Nos referimos concretamente a K, Ca y Mg.

Para establecer contacto con ellos vamos a exponer brevemente su efecto más marcado en la nutrición vegetal.

a. Referencia sobre potasio.

Ya en el año 1929, Bartholomew y Janssen (7) reconocieron el gran interés del potasio en el desarrollo de las plantas, e incluso llegaron a clasificar diferentes tipos de cosechas de acuerdo a sus requerimientos en este elemento. Se sabe que siempre actúa en forma de ión, tiene una gran movilidad dentro del tejido vegetal y es el más importante de todos los iones que intervienen en la hidratación de proteínas; en este último aspecto podemos señalar que los síntomas que acusan la deficiencia de potasio están siempre en relación con el metabolismo del agua en la planta, por otra parte, su acción reguladora en los fenóme

.../

nos osmóticos contribuye a mantener el turgor de la célula vegetal evitando marchitamientos y necrosis.

Hay que señalar también la importancia del potasio en la actividad cambial y meristemática, según ha puntualizado Penston (97) en sus trabajos con tallo de tomate. Russell (106) por su parte, indica la probable intervención del potasio en la fotosíntesis, al observar que una prolongada deficiencia de este elemento puede conducir a una pérdida de actividad en los cloroplastos, lo que supone una alteración en el ritmo de fotosíntesis, acompañada de incremento respiratorio y, por tanto, pérdida en el contenido de carbohidratos. Después de los trabajos de Janssen and Bartholomew (59) se han fijado unos niveles intermedios de potasio que favorecen la fotosíntesis y disminuyen adecuadamente la respiración.

Otra acción importante de este elemento ha sido señalada por Webster (144) como consecuencia de sus estudios con microscopios de gusano, y se refiere a su intervención en el metabolismo de proteínas, que es igualmente favorecido por la presencia del fósforo.

En alguna de sus funciones, el potasio puede ser reemplazado por el sodio, si bien ambos se muestran antagonistas en determinados procesos de activación enzimática. Persall and Hamby

.../

demuestran un claro antagonismo entre potasio y calcio sobre algunas enzimas y de manera muy definida sobre la plasticidad de la pared celular.

b. Referencia sobre calcio.

Otro de los elementos que consideramos, el calcio, tambien tiene funciones en cuanto ión libre en la célula vegetal, pero a diferencia del potasio, es inmovil en la planta y puede presentarse a su vez en forma orgánica como componente celular, siendo de gran importancia su función en la estabilidad de la pectina en la lámina media de la pared celular. Heilbrunn (49) demostró el efecto del calcio sobre la fosforilasa y su intervención en el transporte iónico a través de membranas. Después de sus estudios con plantas de algodón Joham (60) aclaró la intervención del calcio en la formación de compuestos carbonados así como en el transporte de dichos compuestos en la planta.

Donde la misión del calcio adquiere gran interés es en el crecimiento y desarrollo estructural, como consecuencia de su acción sobre la organización de la cromatina y del uso mitótico, lo que hace que su deficiencia llegue a producir mitosis anormales o incluso a impedir las normales. A Staffensen (121) se debe el estudio que relaciona las anormalidades cromosómicas con la concentración de calcio, y por su parte Kirby (69) demostró la capacidad del DNA para formar complejos con iones divalentes

ciones que se producen en plantas que crecen con deficiencia en este tipo de iones.

También influye el calcio en la hidratación de proteínas y puesto que de ello depende el turgor de la célula y la actividad enzimática, su intervención puede extenderse a todas las reacciones fisiológicas.

La relación Ca/K decide amplios aspectos del desarrollo vegetal. Cuando su valor es alto se observan hojas anchas, con nerviaciones muy marcadas y entrenudos cortos. Según Pearsall and Hamby (96) una alta concentración de calcio aumenta el número de células en mayor proporción que el potasio, si bien es cierto que al potasio se debe la mayor plasticidad de la pared celular.

c. Referencia sobre magnesio.

Así como los síntomas de deficiencia de calcio aparecen siempre en los órganos jóvenes, la deficiencia en magnesio es típica de órganos más viejos y se manifiesta en forma de clorosis que aparecen en áreas donde el tejido pierde su facultad asimilativa.

El Mg como componente de la célula vegetal aparece en un 50% en forma de ión libre. Una de sus importantes funciones es como activador de enzimas especialmente en la fotofosforilación

y síntesis proteica y también como componente de pectina y sales de fitina. Es un elemento muy móvil en la planta, que interviene en los procesos de división celular, de modo análogo al calcio según indica Steffensen (120).

Su indiscutible papel en la fotosíntesis se debe a que casi un 15% del total de Mg figura como componente de clorofilas, y en consecuencia el primer síntoma de su deficiencia es la clorosis que aparece en las hojas más viejas y tiene su origen en la destrucción de clorofila.

Hemos de tener en cuenta que el metabolismo normal del vegetal solo es posible con la cooperación de todos los factores de desarrollo y que la consideración de un factor aislado puede prestar una ayuda parcial, pero siempre insuficiente para el conocimiento del proceso de nutrición vegetal.

La armonía y coordinación entre todos los factores nutritivos están regidas por determinados genes que son, en definitiva, los impulsores de los distintos procesos que integran el metabolismo de la planta.

Con el fin de que nuestras experiencias en el campo marcado satisfagan las exigencias nutritivas del material utilizado, hemos recurrido a la solución recomendada por Hoagland y Arnon (52) que contiene equilibrados todos los factores precisos en la nutrición vegetal.

.../

C. LA PLANTA COMO HABITAT DE BACTERIAS FITOPATOGENAS.

La consideración que en el presente estudio se concede al vegetal, es en cuanto puede llegar a constituir un hábitat adecuado para bacterias de acción fitopatógica, por ello hemos creído oportuno prestar la atención debida a los componentes principales de la célula vegetal, como son las sustancias reductoras, componentes pécticos, aminoácidos, proteínas, etc. etc., ya que su presencia puede relacionarse con el desarrollo del parásito, como lo justifica el hecho de la acumulación de ciertos productos en el punto de infección (18) Perombelan and Lowel (98) suponen que la virulencia de un microorganismo no es necesariamente una cualidad intrínseca, sino una consecuencia de la posibilidad de desarrollarse en un lugar determinado.

D. ENFERMEDADES PARENQUIMATOSAS OBSERVADAS EN PLANTAS Y SUS CARACTERISTICAS.

La utilización de los componentes celulares y las alteraciones que experimentan por acción microbiana, conducen a la aparición de una serie de lesiones y síntomas externos en el vegetal, que desde tiempos muy lejanos se han aceptado para identificar los diferentes tipos de enfermedades. De todos estos tipos de enfermedades hemos decidido considerar las que afectan fundamentalmente al tejido parenquimatoso y cursan con ablandamiento, pérdida de rigidez y desintegración de los tejidos vegetales, siendo conocidas con el nombre de podredumbres.

.../

El proceso fundamental que decide la aparición de podredumbres se localiza a nivel de la membrana celular, por ello creemos oportuno conceder una breve atención a la constitución de esta pared.

Preston (100) y Rogers and Perkins (103), entre otros, se han dedicado a estudiar la estructura de la pared en la célula vegetal, pero su diversidad es tan grande que difícilmente puede establecerse un tipo único. Ya en 1893 Mangin (78) recurrió al rojo de rutenio para observar al microscopio ordinario la estructura de la pared, y posteriormente se desarrollaron nuevas técnicas por Wood (152), Albersheim (4), Codner (25), etc. hasta llegar a los modernos métodos de Sterling (122) basados en la difracción.

De acuerdo con Wood (150) cabe distinguir en la pared de la célula vegetal la llamada lámina media, que tiene su origen en la división mitótica de la célula: la placa que aparece en la telefase para separar las nuevas células formadas, se transformará en lámina media una vez concluida la división celular. Al iniciar la nueva célula su desarrollo va a sintetizar una nueva capa bajo dicha lámina media, a la que se da el nombre de pared primaria. A continuación, y después de concluir el crecimiento celular, se inicia la formación de otra segunda capa, que se depositará sobre la primera, pasando a formar la llamada pared secundaria.

En cuanto a la composición química de todas estas estructuras, conviene resaltar que la lámina media está constituida casi en su totalidad por sustancias de naturaleza péctica, originadas por polimeriza

ción de ácido D-galacturónico con uniones -1.4. Unidas a las cadenas pécticas aparecen proteínas, azúcares del tipo de arabinosa y galactosa, además de ciertos cationes polivalentes como Ca y Mg que forman puentes iónicos entre los grupos carboxilo.

La pared primaria contiene material péctico y celulósico, constituido en su mayoría por hemicelulosas, así como por xilanos, galactanos, arabinogalactanos, etc. etc.

Y respecto a la pared secundaria, está formada casi exclusivamente por celulosa, que alcanza desde un 5% en las fibras de algodón hasta un 12% en las plantas verdes. También es componente importante la lignina, material difícilmente degradable, cuya unidad básica estructural es un fenilpropanoide.

Pues bien, en las enfermedades parenquimatosas a que nos vamos a referir, el microorganismo patógeno ha de degradar la pared de la célula vegetal para penetrar en el interior de esta célula, donde utiliza el material que precisa para su desarrollo y multiplicación y seguidamente sigue atacando células adyacentes y avanzando a través del tejido, que en consecuencia pierde su rigidez, se hace blando y desaparece como elemento organizado, dando lugar a la aparición de lesiones externas que anuncian la enfermedad y a la larga la muerte de la planta.

.../

**E. - BACTERIAS CAUSANTES DE PODREDUMBRES
ABLANDAMIENTOS EN TEJIDOS VEGETALES
ERWINIA CAROTOVORA.**

Se comprende por lo expuesto, la importancia de la pared celular en la propagación de enfermedades blandas y podredumbres que, como vemos, exigen su degradación. Por ello, los patógenos capaces de ocasionar este tipo de enfermedades han de disponer de algún mecanismo que les permita destruir dicha pared. Si tenemos en cuenta que los principales componentes de la pared son pectinas y celulosa, es lógico que las armas de ataque del patógeno sean enzimas pectolíticas y celulolíticas.

Por estas razones otro de los aspectos a considerar en el presente trabajo es el que se refiere a los microorganismos que causan podredumbres, con especial atención a sus requerimientos nutritivos y a su capacidad de síntesis enzimática, que son en definitiva los factores en los que reside su potencial patogénico.

De todos los agentes que causan podredumbre, nuestro interés se centra concretamente en el grupo bacteriano, y dentro de él, en aquellas bacterias que se han incluido en el género Erwinia.

Este género ha sido uno de los más difíciles de encuadrar dentro de una taxonomía de aceptación general y las especies que en él se incluyen han sufrido igualmente las dificultades de una clara clasificación.

.../

A fin de evitar confusiones en nuestra exposición, creemos conveniente dedicar un comentario a las características atribuidas al género Erwinia, con especial dedicación a la especie E. carotovora.

En 1917 Winslow () admitía en el género Erwinia a bacterias que tenían como única característica ser responsables de podredumbres vegetales, lo que no vino a traer ninguna claridad al problema, dada la gran variedad de bacterias que pueden producir este tipo de lesiones en las plantas. Los bacteriólogos americanos, basándose en la gran semejanza de este grupo de bacterias fitopatógenas respecto a las incluidas en la familia Enterobacteriaceae las incluyeron en la 6ª edición del Bergey's Manual de 1948, dentro de esta misma familia, es decir, como enterobacterias.

Waldee (139), apoyado por otros autores, propone llamar Erwinia a especies no pectolíticas y crear el género Pectobacterium, para aquellas que así lo sean, con lo que nos encontramos con la especie Pectobacterium carotovorum en sustitución de Erwinia carotovora.

Komagata et Al (71) señalan que además de las especies E. carotovora y E. amylovora, debe admitirse una nueva con el nombre de E. herbicola y Dye (33) sugiere ampliar el grupo para incluir E. atypica.

De los criterios que han ido sucediéndose, todos tienen una base aceptable pero ninguno ha llegado a imponerse sobre los demás y hoy sigue hablandose de Erwinia carotovora, como nomenclatura de mayor definición, incluyendo esta especie dentro de la familia Enterobacteriaceae perteneciente a su vez al orden Eubacteriales.

Ultimamente se ha querido aplicar nuevos criterios en la taxonomía bacteriana, no solo ya por el grado de comunidad antigénica (76) sino también por especificidad de fagos e incluso por el cálculo de % G.C. y el % de recombinación en cruces sucesivos (16).

Respecto al % GC se ha llegado a conocer su valor para la mayoría de enterobacteriaceas (117) y así se sabe que a E. amylovora corresponde un 53'9% GC, E. carotovora tiene 52'1 % GC y E. herbicola presenta 55% GC, quedando estas especies, por lo tanto, claramente delimitadas.

Por ser E. carotovora la bacteria que vamos a utilizar para llevar a cabo nuestro estudio, hacemos su presentación en la fotografía siguiente obtenida en el microscopio electrónico. Se trata de un cocobacilo de 1,2 a 3 de longitud, gram negativo, con flagelos peritricos que suele encontrarse aislado o formando pequeñas cadenas, es anaerobio facultativo, forma colonias redondas y blancas en placas de agar común, crece entre 4° y 38°C, aunque su óptimo está a 25°C.

.../

Asimila gran número de hidratos de carbono, reduce los nitratos, licua la gelatina, produce coagulación ácida en la leche, asimila citratos como única fuente de carbono, no produce SH_2 , no forma indol, tampoco amonio a partir de urea y da negativa la reacción de Voges-Proskauer.

F. NUTRICION INORGANICA BACTERIANA

Cómo datos de interés, que nos conviene resaltar en Erwinia carotovora figuran su nutrición inorgánica y la síntesis de enzimas peptolíticas.

Sin duda se debe a Pasteur la primera demostración acerca de la indiscutible importancia de las sustancias inorgánicas sobre el crecimiento y desarrollo de microorganismos. También se conoce el control genético que decide la selección y absorción de los elementos que necesita cada microorganismo y que pueden llegar a constituir una característica diferencial entre especies. Las exigencias son tan individuales que resulta difícil llegar a establecer con carácter general una división entre elementos esenciales y no esenciales para los microorganismos.

Con el fin de concretar para un microorganismo determinado si un elemento es o no esencial para su desarrollo, Arnon (5) ha propuesto considerar los siguientes postulados:

1. El microorganismo exige para completar su ciclo vital, del elemento en cuestión.
2. La acción del elemento sobre el microorganismo, ~~de~~

específica, sin que pueda reemplazarse por otro.

3. El efecto ejercido por el elemento sobre el microorganismo ha de ser directo.

Considerando solamente los tres elementos K, Ca y Mg que vamos a estudiar en el presente trabajo, vamos a hacer una revisión muy breve de su importancia en la nutrición de los microorganismos.

Según Rubenstein et al. (105) la mayor parte de los microorganismos requieren la presencia de potasio, aunque son frecuentes los casos de interacciones iónicas en las que este elemento puede ser parcialmente sustituido por Na o Rb (74). Se conoce su intervención en el metabolismo de hidratos de carbono (24), también interviene según Evans & Sorger (38) como activador de algunos grupos de enzimas y asimismo juega un papel central en la osmorregulación bacteriana (37) y en el sostenimiento de la estructura ribosómica.

En cuanto al calcio, se ha señalado como esencial para algunas bacterias, entre las que figura el Azotobacter, que lo precisa para la fijación de nitrógeno. Interviene también en los fenómenos de fosforilación y transporte a través de membrana, en la síntesis de proteasas (107) sobre enzimas pépticas, etc. etc.

Los requerimientos en magnesio por los microorganismos alcanzan grados más elevados que en el caso del calcio, habiéndose demostrado

.../

en varias ocasiones una interacción muy concreta entre ambos elementos, de forma especial cabe señalar los estudios de Provasoli (101) utilizando una amplia variación de microorganismos y modificando la relación Ca/Mg entre los valores 24:1 y 1:24.

Según Webb (172) para muchas bacterias, el magnesio es necesario para el proceso de división, también interviene en los procesos de fosforilación y con frecuencia participa en la unión entre sustrato, enzima y coenzima (107) en sus estudios con Staphylococcus pyogenes señala la decisiva influencia que sobre el crecimiento de esta bacteria ejerce la interacción Ca/Mg.

En el caso de la bacteria de que nos vamos a ocupar, Erwinia carotovora, utilizaremos una sal de las que señalan Hoagland y Arnon (52) de cada uno de los elementos K, Ca y Mg, para estudiar en cada caso la intervención concreta que aisladamente ejerce cada uno de ellos en el metabolismo bacteriano.

G. SINTESIS DE ENZIMAS PECTOLITICAS

Dentro de este metabolismo, consideramos, por su gran trascendencia, el aspecto que se refiere a la síntesis de pectinasas por E. carotovora. La trascendencia a que nos referimos se relaciona con la naturaleza enzimática de la maceración y des

.../

trucción de tejidos vegetales, según fué sugerido por Jones en 1909 (64). Posteriormente ha sido demostrado, al purificar las enzimas de la maceración, su identificación con endopoligalacturonasas y endolasas que rompen las sustancias pécticas por la unión $-1,4$. A estas conclusiones han llegado distintos investigadores, entre los que merece destacarse, Demain y Phaff (30), Dean y Wood (29), Bateman (9), Byrde y Fielding (21), etc. etc.

Dentro del grupo de las pectinasas cabe distinguir una serie de enzimas cuya acción sobre el sustrato péctico es muy específica.

A grandes rasgos, las principales enzimas de este grupo son:

- Poligalacturonasa (PG) que utiliza como sustrato el ácido péctico al que hidroliza por sus uniones $-1,4$ dando lugar a la aparición de ácidos urónicos, con distinto grado de polimerización.
- Pectinmetilesterasa (PE) que hidroliza los esteres metílicos de la pectina formando ácido péctico y metanol.
- Polimetilgalacturonasa (PMG) que actúa sobre pectina rompiendo sus enlaces $1,4$, con lo que acorta las cadenas pécticas y hace aparecer nuevas propiedades por pérdida de viscosidad.
- Poligalacturonato transeliminasa (PATE) y pectintranseliminasa (PTE) enzimas descritas por Albensheim (2) y purificadas por Starr y Moran (113).

El sustrato para PATE es el ácido péctico y produce hidrólisis con

transeliminación, originando compuestos desaturados con absorción máxima a 230 m.

La enzima PTE utiliza como sustrato pectina, que degrada por un mecanismo análogo a PATE y produce compuestos desaturados con absorción máxima a 235 m.

- Oligogalacturónico trans-eliminasa, actúa sobre ácidos digalacturónicos saturados e insaturados y los degrada hasta ácido D-monogalacturónico y deoxiceturónico.

La influencia de enzimas pectolíticas sobre la infección bacteriana del tejido vegetal ha merecido gran atención por parte de numerosos fitopatólogos, basta recordar a autores como Smith (169), Bateman y Miller (31), Knösel y Lange (70) y otros.

Puede aceptarse, por tanto, que las enzimas pécticas, producidas por el patógeno, guardan relación con la aparición de los síntomas que caracterizan la enfermedad vegetal y que todos los factores que pueden intervenir en la inducción y represión de estas enzimas afectan, por consiguiente, a la gravedad de las lesiones que aparecen en los órganos vegetales.

H. PLANTEAMIENTO DEL TEMA

Recordando que el huésped constituye el hábitat del microorganismo patógeno, sus constituyentes han de influir en el desarrollo

.../

de este (12) y en la producción bacteriana (33) y puesto que estas constituyentes varían, entre otras causas, por las condiciones de fertilidad de la zona en que la planta se desarrolla, hemos de admitir la influencia del suelo en la propagación de la enfermedad vegetal. Por ello, el tema que nos hemos propuesto en el presente estudio, pretende relacionar la nutrición vegetal con la resistencia de la planta a la infección bacteriana.

Se ha elegido entre los vegetales ensayados, la judía (Phaseolus vulgaris L.) que dispone de los factores nutritivos que incluye Hogland (52) en su conocida solución. Estos factores se modifican respecto a su contenido en NO_3K , $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ y $(\text{SO}_4)\text{Mg}$, manteniendo siempre el carácter equilibrado de la solución.

Estudiamos, por análisis del vegetal, las modificaciones químicas que experimentan los tejidos de la planta y seguidamente vemos las modificaciones en la susceptibilidad de judía, frente a *E. carotovora*, condicionadas por los diferentes regímenes nutritivos de la planta.

Con ello pretendemos llegar a un control de la propagación de enfermedades vegetales mediante la alteración conveniente de la nutrición del huésped y consiguientemente de su fisiología, lo que viene a justificar el título dado al estudio que presentamos a continuación.

II. MATERIAL Y METODOS

II - MATERIAL Y METODOS

A.- MICROORGANISMO PATOGENO

1. Procedencia y conservación.

Como ya hemos indicado, para la realización de este trabajo, hemos escogido como microorganismo patógeno a la enterobacteria Erwinia carotovora. Se ha empleado la estirpe 312, procedente de la Colección Nacional de Bacterias Fitopatógenas de Harpenden (Inglaterra), que conservamos a 4°C en agar extracto de judía. Este medio de mantenimiento se obtiene de la forma siguiente:

Una cantidad conocida de judía verde se tritura y se homogeneiza con agua destilada en la proporción de 2 litros por kilogramo de judía. Seguidamente se filtra y el líquido resultante se esteriliza durante 20 minutos a 120°C en autoclave, para después incorporarlo al 2% en agar común. El pH de este medio debe estar compen

.../

Las siembras se efectúan semanalmente y en todos los ensayos usamos cultivos jóvenes de 24 horas.

La virulencia de esta bacteria se exalta mediante pases periódicos a través de la planta huésped Phaseolus vulgaris. L.

La pureza del cultivo se controla por observación minuciosa de la morfología de sus colonias en siembra sobre placas en agar común, y por la ejecución de tinciones de Gram que se examinan directamente al microscopio óptico.

2. Medios de cultivo.

El medio de cultivo en el que hemos encontrado un mejor crecimiento de la citada bacteria es el indicado por Smith (109).

Su composición es la siguiente:

Sol. A

Pectina	5,0	g.
Glucosa	0,5	g.
Agua	500	ml.

Sol. B

Triptona		5,0	g.
(NH ₄) ₂ HPO ₄		2,0	g.
Extracto de levadura	2,5	g.

.../

L-asparagine	1,0	g.
Na ₂ HPO ₄	0,05	g.
K ₂ HPO ₄	0,05	g.
Agua	2.000	ml.

La asparagine se disuelve aparte y se añade a los otros componentes, disueltos previamente en 1.500 ml. de agua. Se ajusta el pH a 7,0 y se lleva el volumen hasta 2.000 ml.

Las soluciones se esterilizan por separado y una vez frías se mezclan en la proporción de 25 ml. A/100 ml. B; quedando así dispuestas para su uso.

El mismo medio que queda descrito es el utilizado para conocer la influencia que sobre la bacteria E. carotovora pueden ejercer distintos cationes a los que se atribuyen acciones muy concretas en la patogenesis bacteriana. En nuestro estudio estos cationes son K⁺, Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺.

Al medio que preparamos para este tipo de ensayos se le incorpora, previamente esterilizado, una solución de una de las siguientes sales: NO₃K, (NO₃)₂Ca 4H₂O y SO₄Mg 7H₂O. Esta incorporación se practica de forma que cada uno de los compuestos indicados al cance, en el medio de cultivo, una serie de concentraciones que correspondan a 0,5; 0,75; 1,5; 3,0; 4,0; 5,0 y 6,0%.

.../

Hemos de hacer notar que en el caso de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ su concentra
ción en el medio está condicionada por la presencia del resto de
los componentes, como consecuencia de las reacciones de precipi
tación que con alguno de ellos se originan. Por esta razón en las
experiencias que practicamos con $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$, su máxima concentra
ción tan solo alcanza al 2,0%.

3. Condiciones de incubación.

El cultivo de E. carotovora se efectua distribuyendo cualquiera
de estos medios en matraces Erlenmeyer de 100 ml. que llevan
adosado un tubo calibrado para seguir la curva de crecimiento bac
teriano en un Spectronic 20, Bausch and Lomb a 600m μ .

Como inóculo se emplea un cultivo de 24 horas sobre agar común
o agar extracto de judía, según los casos y la incubación tiene lu
gar a 25°C en un agitador Gallenkamps, regulado para obtener 100
sacudidas por minuto.

El periodo de incubación varía de acuerdo a las exigencias de cada
experimento.

Ademas de seguir la producción celular se emplea cada uno de los
cultivos para determinar en ellos la capacidad de síntesis enzimáti
ca de la bacteria. Estos ensayos se refieren a PG, PATE y PTE
y se practican en los líquidos metabólicos que resultan de centrifu
gar el medio de cultivo a 3.000 r.p.m. durante 15 minutos.

4. Representación de crecimiento.

De cada uno de los medios en los que se cultiva Erwinia carotovora se obtiene la correspondiente curva de crecimiento que se traza tomando las lecturas, en % de transmisión, a 600 m μ de las sucesivas fases de desarrollo de la bacteria. Se emplea un Spectronic 20, Bausch and Lomb, al que se llevan los cultivos con la periodicidad que cada ensayo exige. El tubo calibrado, que va adosado al Erlenmeyer, donde se cultiva la bacteria, facilita la lectura, sin pérdida de material, garantizando la ausencia de contaminaciones.

5. Microscopia.

La observación morfológica de la bacteria se efectúa tanto en microscopio de luz como en electrónico.

En el primer caso se emplea un aparato Leitz-Wetzlar, y el electrónico corresponde a la firma Siemens, Elmiskop, I.a. y pertenece al Servicio de Microscopia electrónica del Patronato "Santiago Ramón y Cajal" del C.S.C.C.

Los cultivos en todas sus fases van siendo observados periódicamente mediante tinciones simples y de Gram, para comprobar su pureza y morfología y solo en aquellos casos en que se aprecian cambios de interés se someten las muestras correspondientes al microscopio electrónico. Estos casos son los que figuran en el siguiente cuadro, en el que se incluye un testigo que corresponde a Erwinia carotovora desarrollada en el medio normal de Smith.

nº muestra	% NO ₃ K	% (NO ₃) ₂ Ca	% SO ₄ Mg
1	3 %	-	-
2	4 %	-	-
3	4,6 %	-	-
4	-	0,75 %	-
5	-	1,25 %	-
6	-	1,5 %	-
7	-	-	3 %
8	-	-	7 %
9	-	-	10 %
10	TESTIGO		

Las muestras sometidas a observación electrónica se preparan mediante dos técnicas diferentes, como son tinción negativa y sombreado, que detallamos a continuación:

La tinción negativa requiere una rejilla cubierta por una película muy fina formada por carbón vaporizado. Sobre ella se coloca la suspensión acuosa de la bacteria y seguidamente la misma cantidad (10) de ácido fosfotungstico al 2% y pH 7, según recomiendan Hall et al (47) y Watson (141), con lo que la concentración final del fosfotungstico se reduce a 1%, que es la que señalan Brenner y Horne (16) como más conveniente. Transcurridos cinco minutos se separa el exceso de líquido mediante una micropipeta, dejando secar la preparación, antes de ser observada al microscopio electrónico.

La técnica en sí resulta muy delicada por las alteraciones que el ácido tungstico puede ocasionar en las estructuras bacterianas y con el fin de evitar cualquier alteración, hemos procedido a fijar previamente las bacterias mediante una solución de formaldehído al 2%, siguiendo las indicaciones de Gibbs et al (43).

Para la técnica de sombreado se han seguido las normas de Williams y Wickoff (148), basandonos en el poder de dispersión de los electrones (23). Se emplea un hilo finísimo formado por una aleación de oro y paladio, que se coloca en forma de V, sobre un filamento de Wolfranio por el que se hace pasar una corriente, en condiciones de alto vacío (5×10^{-5}) hasta que se haga incandescente. En estas condiciones se desprenden pequeñas partículas de la aleación, que

se hacen caer, en forma de lluvia, sobre la preparación con la bacteria que va dispuesta en una plataforma giratoria. El giro que se imprime decide el angulo de sombreado que presenta la preparación.

6. Síntesis y valoración de poligalacturonasa (PG).

Se han utilizado dos técnicas diferentes para su valoración. Una de ellas se debe a Dingle et al (32) y se practica en placas Petri sobre una lámina de 4 mm. de pectato sódico en la que se perforan una serie de pocillos donde se alojan las muestras a valorar. Transcurridas 18 horas a 37°C la actividad PG se pone de manifiesto por la aparición de halos, despues de revelar con ClH, 5 N.

La otra técnica se basa en la determinación iodométrica de grupos reductores, que se efectua por el método de Willstätter-Schudel, modificado por Janssen y Mac Donnell (57). La mezcla de reacción contiene 0,75% de pectato sódico; 5%, en volumen, de la muestra a analizar; 0,2% de FNa y tampón Tris-ClH a pH 9,3 hasta alcanzar un volumen final de 20 ml. Despues de incubar durante 5 horas en B.M. a 30 - 32° se toma una muestra de la mezcla de incubación y se lleva sobre CO_3Na_2 1 M para detener la actividad enzimatica y proceder seguidamente a valorar los grupos reductores.

La actividad PG se expresa en mg. de ácido monogalacturónico por ml. del líquido procedente del cultivo bacteriano.

.../

7. Síntesis y valoración de ácido-péctico-transeliminasa (PATE).

Al igual que en el caso anterior, las muestras en las que se valora esta actividad proceden del medio en el que crece la bacteria E. carotovora, del que se separa la población bacteriana por centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 15 minutos.

La técnica se basa en la transformación que experimenta, por acción de esta enzima, la molécula de ácido péctico, que conduce a la aparición de un doble enlace en posición 4 - 5. Este doble enlace es el responsable de la absorción a 230 m μ que permite determinar la actividad enzimática según Nasuno y Starr (88).

Se emplea 0,2 ml. del líquido problema, 0,5 ml. de una solución de Cl_2Ca , $2 \times 10^{-3}\text{M}$ y como sustrato se usa pectato sódico al 0,5% preparado en tampón glicina Na OH pH 8,6 el volumen final de la mezcla se eleva a 10 ml.

El periodo de incubación a que se somete dicha mezcla es de una hora a 30°C en B. M. Transcurrido este tiempo se añade 0,6ml. de $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ al 9% y 0,6 ml. de Na OH 0,5 N, con el fin de detener la acción enzimática. Entonces se forma un precipitado que se separa por centrifugación a 16.000 r.p.m. durante 15 minutos. La actividad de la enzima PATE, se valora en el

sobrenadante resultante mediante lectura directa a 230 m

en un Spectrofotómetro Unicam mod. SP 500, series 2.

Los resultados se expresan por las lecturas espectrofotométricas frente a un blanco, que es la misma mezcla de incubación con la enzima inactivada por calentamiento durante 3 minutos en baño hirviente.

Como complemento al método anterior, en ciertas ocasiones también hemos empleado, el que señalan Ayers y Papavizas. Se basa en la aparición de un compuesto rosado como consecuencia de la reacción entre el ácido tiobarbitúrico y los dobles enlaces de las moléculas urónicas. En este caso la lectura de actividad se realiza a 548 m μ .

8. Síntesis y valoración de pectin-transeliminasa (PTE).

Como el anterior, también esta enzima pertenece al grupo de las enzimas transeliminativas. Sin embargo el sustrato sobre el que actúa es la pectina.

La mezcla de incubación, así como la forma en que se valora su actividad son iguales a las ya descritas para PATE, con la única diferencia de que en este caso el sustrato es la pectina y no el ácido péctico. Asimismo la técnica se basa en idénticas propiedades, si

.../

de onda a la que valoramos su acción mediante lectura en Spectrofotómetro. También aquí los resultados se expresan en % de absorbancia.

B. PLANTA HUESPED

1. Elección de Phaseolus vulgaris. L.

Se ha elegido Phaseolus vulgaris L. en su variedad "aguadulce".

Esta leguminosa se cultiva en condiciones de invernadero. Además de ser un huésped muy sensible a *Erwinia carotovora*, ofrece la ventaja de que su cultivo es muy extenso y, por tanto, no existe dificultad en conseguir semillas seleccionadas en cualquier momento, con la garantía, además, de su alto poder germinativo.

2. Tratamiento de semillas.

Con el fin de evitar contaminaciones y facilitar a la vez su germinación, las semillas se mantienen durante cinco minutos en contacto con una solución de cloruro mercuríco al 2%. Seguidamente se lavan repetidas veces con agua esteril, para llevarlas a continuación sobre papel de filtro humedecido, también con agua esteril, y dispuesto en una placa Petri, que cuidadosamente cerrada se introduce en estufa a 25°C.

3. Siembra en macetas.

Se utilizan macetas de plástico, que se llenan con arena gruesa (1 - 0,5 mm.) lavada intensamente con ácido y posteriormente con agua hasta reacción neutra, en el lavado, se eliminan ade-

mas las partículas de diametro inferior a 0,25 mm.

Esta arena va a constituir el soporte de la semilla que ha iniciado su germinación sobre el papel de filtro húmedo de la placa Petri. En el momento de su traslado a la maceta la semilla en germinación presenta una raicilla de unos 4 cms. de largo. En cada maceta se disponen 5 - 8 semillas.

4. Solución nutritiva.

Hemos recurrido a la conocida solución de Hogland (52) para el riego de las macetas a que nos referimos en el apartado anterior. Esta solución está integrada por tres partes que corresponden a macroelementos (A), microelementos (B) y aporte de hierro (C), que se mezclan adecuadamente antes de su empleo y corresponden a las siguientes fórmulas, según el caso particular estudiado: (paf. 11).

Puesto que pretendemos relacionar la sensibilidad de judia a *E. carotovora* con su nutrición y hemos centrado nuestro intento en el grupo de macroelementos (concretamente en los elementos potasio, calcio y magnesio), la solución de Hogland utilizada en cada caso carece del elemento correspondiente, que es incorporado despues en diferentes concentraciones, a partir de una solución M de su sal más idónea. Las sales empleadas según el caso son:

.../

NO_3K , $(\text{NO}_3)_2\text{Ca} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ que se añaden de forma que su concentración en las distintas soluciones alcanza los valores $2 \cdot 10^{-3}$; 4×10^{-3} ; 8×10^{-3} y 15×10^{-3} M.

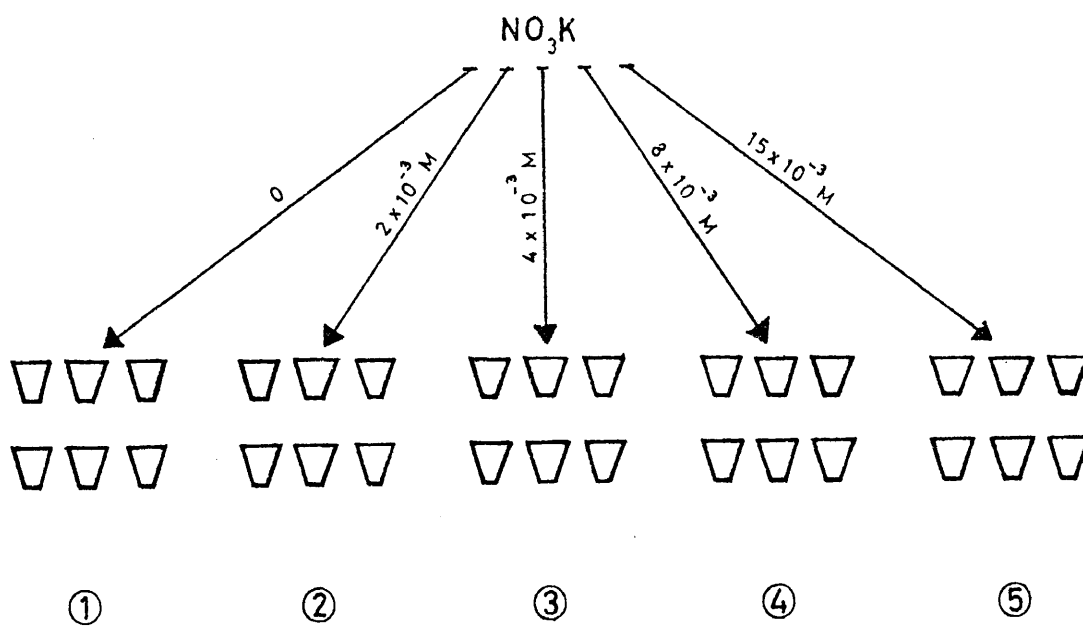
Para cada experiencia se disponen cinco lotes de seis macetas cada uno y cada cual recibe la solución nutritiva con una concentración distinta del elemento que se considera. Uno de los lotes actúa de testigo y se riega con la solución carente del mismo elemento, si bien hay que admitir que pese a la pureza de los compuestos utilizados no podemos afirmar la ausencia absoluta de trazas del elemento que se estudia.

Teniendo en cuenta que cada maceta puede tener 2 - 3 plantas adecuadas para el tratamiento, el número de ellas, que interviene en cada experiencia es suficiente para considerar los resultados dentro de límites plenamente admisibles.

5. Planteamiento general del ensayo.

Con el fin de hacer más comprensible el planteamiento de cada ensayo, lo exponemos gráficamente para el caso de potasio, si bien, es exactamente reproducible para el estudio con calcio y también con magnesio.

HOAGLAND (CARENTE K⁺).



a. Tratamiento de potasio.

Sol. A (ml./litro sol.)

Sol. B (g./litro sol.)

$(\text{NO}_3)_2 \text{Ca}$ 1 M 5 ml.

$\text{BO}_3 \text{H}_3$ 2,86 g.

$\text{SO}_4 \text{Mg}$ 1 M 2 ml.

$\text{Cl}_2 \text{Mn } 4\text{H}_2\text{O}$ 1,81 g.

$(\text{PO}_4\text{H}_2)_2 \text{Ca}$ (0,025 M) 10 ml.

$\text{SO}_4 \text{Zn } 7\text{H}_2\text{O}$ 0,22 g.

$\text{SO}_4 \text{Cu } 5\text{H}_2\text{O}$ 0,08 g.

$\text{MO } \text{O}_4\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g.

Sol. C (0,6 ml./litro, 3 veces por semana)

$\text{SO}_4 \text{Fe}$ 0,5%

Acido tartárico 0,4%

b. Tratamiento de calcio.

Sol. A

NO_3K 1 M 5 ml.

SO_4Mg 1 M 2 ml.

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 1 M 1 ml.

Sol. B

Ver tratamiento de K.

Sol. C

Ver tratamiento de K.

c. Tratamiento de magnesio.

Sol. A

$(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ 1 M 4 ml.

NO_3K 1 M 1 ml.

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 1 M 1 ml.

SO_4K_2 (0,5 M) 3 ml.

Sol. B

Ver tratamiento de K.

Sol. C

Ver tratamiento de K.

.../

Los turnos de riego se establecen periódicamente hasta que las plantas alcanzan un desarrollo óptimo, previo a la floración, con una altura media de unos 38 cms. Una vez alcanzada esta fase se procede a realizar los análisis y experiencias pertinentes según exponemos a continuación.

6. Técnica de inoculación.

Hemos utilizado una técnica sencilla y eficaz que consiste en preparar, a partir de un cultivo de 24 horas de Erwinia carotovora en agar caldo común, una solución acuosa de 10^9 células bacterianas por ml. concentración que conseguimos por lectura de su densidad óptica a $600\text{ m}\mu$ y los cálculos correspondientes mediante la curva que relaciona D.O. con número de células viables.

Esta suspensión se introduce, por inyección con jeringa, en el tallo de la planta y nervio medio de sus hojas.

Se deben emplear agujas finas como las tipo K-1 (20/6) que hemos usado en este trabajo, para no producir heridas grandes que puedan causar más tarde serias lesiones que afectan por si mismas al metabolismo de la planta.

7. Técnicas histológicas.

a. Tratamiento previo.

El proceso que se sigue hasta la realización de los cortes incluidos en parafina y su observación e interpretación al microscopio, inclu

ye los siguientes pasos señalados por Jansen (58).

i) Fijación.

El material vegetal se corta con cuchilla en parte suficientemente pequeñas para que el fijador, en el que se introducen seguidamente, pueda penetrar a través de todas sus estructuras y no sufran ninguna alteración, ya que la solución fijadora inhibe los procesos vitales de la célula, la autólisis y el cambio de propiedades físicas de las sustancias que la componen. Como fijador hemos empleado una mezcla de formalina, ácido acético y alcohol (FAA) en la proporción 5:5:90. En ella se dejan las muestras durante 24 horas aproximadamente.

ii) Deshidratación.

Parafina y agua no son miscibles entre sí, ésta, por lo tanto, es extraída de la planta y reemplazada por un solvente orgánico compatible con la parafina.

Para ello, los tejidos se sumergen en concentraciones de alcohol etílico y seguidamente de TBA (alcohol butílico terciario) de forma sucesiva y durante periodos de 1 hora, hasta llegar al TBA puro, donde termina la deshidratación.

iii) Infiltración de parafina.

El tejido se coloca, con una pequeña cantidad de TBA, sobre una lámina de parafina sólida en el fondo de un pequeño vial. Este se

.../

introduce en estufa a una temperatura ligeramente superior al punto de fusión de la parafina (55 - 60°C). Bajo estas condiciones, la parafina funde y el TBA se evapora. Con objeto de que se elimine totalmente, se hacen 2 a 3 cambios de parafina.

Este proceso requiere unas 12 a 13 horas. Después el tejido se coloca en un molde con parafina, previamente impregnado con glicerina para facilitar el desprendimiento del bloque. Una vez solidificada la parafina, se introduce dicho molde en un baño de hielo donde se enfria rapidamente y el bloque resultante se puede extraer sin dificultad.

b. Obtención de cortes.

De los bloques obtenidos, se recortan porciones más pequeñas que contengan el tejido, estas se montan sobre un taco de madera o metal que se inserta posteriormente en el microtomo, una vez que el pequeño bloque se haya tallado para quitar el exceso de parafina y hacer las caras del mismo paralelas a la superficie de la cuchilla.

Los cortes se realizan en un microtomo rotativo Spencer de parafina y su espesor está comprendido entre las 10 y 15 .

Las secciones se fijan al porta mediante el uso de un adhesivo, nosotros hemos empleado el adhesivo de Haupt, cuya fórmula es:

.../

Glicerina 15 ml.

Agua 100 ml.

Estos portas se guardan en ambiente seco y temperatura próxima a los 30°C. durante 2 - 3 días en que se procede al paso siguiente.

Para eliminar la parafina de los cortes y asegurar una buena tinción de los mismos, los portaobjetos se introducen dos veces en xilol y otra en alcohol - xilol 1:1 durante 10 a 15 minutos en cada uno. Después se someten a una serie de concentraciones decrecientes de alcohol con el fin de rehidratar el tejido y, por último, se sumergen en agua destilada.

c. Tinción, montaje y observación.

Hemos escogido la tinción doble con safranina y "fast-green", según la técnica de Jansen (53).

Las fórmulas de los reactivos que hemos empleado son las siguientes:

Safranina

Safranina	4 g.
Acetato sódico	4 g.
Formol	8 g.
Metil cellosolve	200 ml.
Alcohol de 95%	100 ml.
Agua destilada	100 ml.

.../

Fast-green

Se prepara una solución saturada de fast-green en una mezcla de metil callosolve y alcohol absoluto (V:V). Esta solución se añade poco a poco a otra mezcla de alcohol absoluto y aceite de clavo (1:3) hasta alcanzar la intensidad deseada.

El montaje de los cortes se hace con DP-X dejando caer el cubre objetos cuidadosamente para que no se formen burbujas.

Para su observación se utiliza un microscopio LEITZ-WETZLAR binocular empleando objetivo seco y de inmersión para apreciar con claridad las células lesionadas y el avance de la infección a través del tejido, tanto de tallo como de hoja, perteneciente a plantas de Phaseolus vulgaris. L.

8. Análisis fisicoquímico del tejido vegetal.

a. Determinación de humedad.

Se determina por desecación en estufa a 80°C de la planta íntegra de judía, convenientemente troceada y dispuesta en pesa-sustancias de peso conocido. Las pesadas de la muestra se efectúan periódicamente hasta peso constante, lo que nos permite calcular no solo la humedad del material, sino también del peso seco del mismo.

.../

b. Determinación de pH.

El método de Friedman y Ceponis (40) es el que empleamos en esta determinación. Consiste en triturar una pequeña cantidad de tejido fresco de planta, en un mortero con agua destilada, en la proporción de 10 g. de planta por 12 ml. de agua. La mezcla se filtra por gasa y se mide directamente el pH del extremo resultante en un pHmetro Coleman con electrodos de vidrio.

c. Determinación de iones.

Los elementos que nos interesa determinar son K, Ca y Mg. y para ello sometemos el material a un proceso previo de preparación que permite eliminar la materia orgánica en el tejido vegetal. Este proceso sigue la pauta indicada por Piper (99) y Humphries (54) y consiste en tratar la planta, sin raíz y perfectamente lavada con ácido perclórico, nítrico y SO_4H_2 . El tratamiento se hace en caliente, la temperatura se regula cuidadosamente con el fin de que no se destruyan los elementos que se intenta determinar. La operación se da por concluida cuando el aspecto de la mezcla es el de un líquido transparente e incoloro. Este líquido convenientemente diluido es el que se utiliza para analizar los elementos que hemos indicado.

i) Potasio.

Se parte de la muestra preparada como se acaba de indicar, siguiendo la técnica del fotómetro de llama. Para ello hemos utili

sado un espectrógrafo Hilger E 476 de gran dispersión con óptica de cuarzo y electrodos de cobre entre los que se establece una diferencia de potencial de 30 a 35 voltios.

El tiempo de exposición para el registro de un espectrograma es de 3 minutos.

Para medir las densidades de ennegrecimiento de las líneas espectrales se emplea el fotómetro Hilger H - 451.

Como método espectrográfico se emplea el de comparación interna.

Con este fin, utilizamos el hierro que se introduce en los patrones en forma de óxido férrico al 10%.

La línea espectral correspondiente al potasio es de $4047,22 \overset{9}{\text{\AA}}$ com
parada con la $4005,24 \text{ \AA}$ de hierro.

Los cálculos se hacen mediante una curva standard obtenida con concentraciones conocidas del elemento que se estudia y los resultados se expresan en tanto por ciento, referido al peso en g. de la planta.

ii) Calcio.

El material que utilizamos es el mismo que hemos indicado en el caso del potasio, e igualmente aquí, se emplea la técnica del fotómetro de llama, ejecutada de igual forma a la anteriormente descrita, si exceptuamos que al calcio le corresponde una línea espec

tral de 3933,67 Å, comparada con la 4005,24 Å de hierro.

La curva preparada con concentraciones conocidas de calcio nos permite calcular los resultados que se expresan en tanto por ciento.

iii) Magnesio.

Como hemos indicado más arriba, se emplea la misma muestra utilizada en las determinaciones precedentes. En este caso el método seguido requiere el empleo del fotómetro de absorción atómica, pero con esta excepción y habida cuenta de que la línea espectral del magnesio se define a 2795,54 Å, el proceso seguido para conocer la cantidad de Mg en el tejido vegetal, es similar al indicado para los elementos ya descritos; es decir, también en este caso se construye la correspondiente curva standard que nos permite calcular la concentración de Mg en tanto por ciento, que es como la expresamos en el resultado final.

d. Extracción de azúcares y aminoácidos.

Una vez eliminada la raíz de la planta y después de haber pesado ésta, seguimos el método de Rohrer y col. (104).

A una cantidad conocida de planta se agrega alcohol absoluto en la proporción de 4 ml. por gramo de tejido fresco. La mezcla se

.../

homogeiniza perfectamente por trituración del tejido vegetal y se calienta a B.M. durante 2 a 3 minutos, seguidamente se deja en reposo a temperatura ambiente. A las 24 horas la pulpa resultante se filtra mediante una gasa, el extracto alcoholico se retira, mientras que el residuo obtenido se somete de nuevo, por dos veces más, a los procesos de extracción que hemos indicado. Finalizados estos procesos, se combinan la totalidad de los extractos alcoholicos que hemos ido separando y la mezcla se lleva a evaporación hasta sequedad. El residuo que resulta se vuelve a disolver en stanol de forma que el extracto alcance una concentración final de 2 g. de tejido fresco de planta por ml.

i) Análisis de azúcares. Cromatografía en papel.

Utilizamos papel Whatman nº 1, seguimos la técnica monodimensional descendente de triple resolución. Como eluyente se han probado distintas mezclas, de las que ha sido seleccionada entre todas la que indican Lato y col. (73), formada por etilacetato : isopropanol : ácido acético : agua, en las proporciones 35:100:60:35:30.

El cromatograma se desarrolla a 20°C durante periodos de 18 horas. Como revelador se emplea ftalato de anilina, preparado a partir de 4,65 g. de anilina y 8 g. de ácido ftálico, disueltos en 500 ml. de n-butanol saturado con agua. Despues de tratado

.../

con este revelador, el cromatograma se mantiene durante un par de minutos en cámara a 100 - 105°C con lo que los distintos azúcares presentes en la muestra aparecen en el color que les caracteriza.

La identificación de cada uno de ellos se consigue por determinación de su R_f y, principalmente, por comparación con un control en el que intervienen como testigos azúcares conocidos, que se cromatografían simultáneamente con el problema.

Cromatografía en capa fina.

La cromatografía en capa fina la practicamos según las normas de Stahl (114) y Smith (108), se han empleado placas de 200 X 200 mm. que preparamos en el laboratorio con Kieselgel G-(7731) a un espesor no superior a 100 micras. Para su activación se las mantiene durante una hora en estufa a 110°C.

El eluyente que se utiliza es el mismo que en el caso de cromatografía en papel, y la técnica seguida es monodimensional ascendente. También se revelan con ftalato de anilina e igualmente se llevan, a continuación, a una estufa de 110°C para que aparezcan las manchas correspondientes a cada uno de los azúcares. La preparación de una placa idéntica, donde se disponen azúcares conocidos, permite una clara identificación de todas las manchas que aparecen en la placa con el problema.

ii) Análisis de aminoácido.

En el mismo extracto alcohólico, que hemos obtenido según Rohringer y col. (104), el que utilizamos para estudiar los aminoácidos libres que contiene el tejido de Phaseolus vulgaris. Mediante esta técnica no solo conseguimos una buena extracción de aminoácidos vegetales sino también de las sustancias azucaradas, lo que constituye una evidente ventaja en la marcha del proyecto que estudiamos.

El método seguido para la identificación de aminoácidos es el cromatográfico, que se aplica mediante tres técnicas diferentes.

Cromatografía en papel.

Se lleva a cabo en su modalidad monodimensional descendente y mediante el empleo de papel Whatman nº 1. El eluyente que permite una resolución más completa es el que indican Rohringer y col. (104) que consta de n-butanol, ácido fórmico y agua (75:13:12), que hacemos actuar tres veces sucesivas para mejorar la separación analítica.

Entre todos los reveladores ensayados, decidimos aceptar el que señalan Moffat y col (82), que se prepara, en el momento de su empleo, a partir de dos soluciones, que tiene la siguiente composición:

.../

Sol. A: - Ninhidrina al 0,2%

en alcohol absoluto 50 ml.

Acido acético glacial 10 ml.

2, 4, 6 - collidina 2 ml.

Sol. B: - Solución alcoholica al 1% de

nitrate cúprico trihidrato.

La relación en que se mezclan es 25 ml. de la primera y 1,5 ml. de la segunda solución.

Una vez tratado el cromatograma con el mencionado reactivo, se deja secar de 2 a 3 minutos en una estufa a 105°C. Seguidamente los aminoácidos se resuelven tomando diferentes tonalidades que nos ayudan a identificarlos por comparación a la muestra de aminoácidos que utilizamos como patrón, además de considerar los R_f correspondientes.

Cromatografía en capa fina.

Se sigue el mismo método general que hemos descrito en el caso de los azúcares, si bien aquí, el solvente y revelador son los que acabamos de describir en la técnica de cromatografía en papel, para aminoácidos.

.../

La composición de la capa sobre la que va a desarrollar el cromatograma responde a la fórmula.

Kieselgel G (Merck) 25 g.

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,2 N 25 ml.

$\text{PO}_4\text{H Na}$ 0,2 N 25 ml.

Para la identificación se utilizan soluciones patrones de aminoácidos conocidos, que se preparan en alcohol isopropílico y a una concentración 0,01 M.

Analizador de aminoácidos.

Hemos utilizado el Analizador JLC - 5 AH, Joel, siguiendo la técnica recomendada por Spackman (111) que transcurre a 60°C en columna de poliesterano sulfonado. Cada experiencia se programa para seis muestras y consume un tiempo que oscila de 40 a 44 horas. Como eluyente se emplea tampón de citrato sódico que se prepara a tres pH diferentes y contiene 0,1% de fenol para evitar posibles contaminaciones. Los aminoácidos de carácter neutro y ácido se eluyen con tampón 0,2 N y pH de valores 3,25 y 4,25, con una velocidad de flujo de 15 ml/h. Por el contrario, para los aminoácidos básicos se requiere el tampón a pH 5,28 y 0,35 N, siendo su razón de flujo aproximadamente el doble a la anterior.

.../

Las muestras problema se preparan a partir del extracto que empleamos en la cromatografía en papel, después de haber sido tratado con carbón activo para quitarle su color, y obtener así un líquido transparente, que se mezcla con ClH 0,01 N, de forma que se alcance una concentración de 50 a 100 mg. de planta por ml. y un pH de 3,2.

Los resultados que se obtienen son cuantitativos, mediante un sistema automático de grabación que recoge el color desarrollado al mezclarse el eluyente con una solución de ninhidrina preparada según Moore y Stein (85). Esta intensidad de color se determina por fotometría continua a 570 y 440 m μ y se refleja en papel especial con escala logarítmica que reproduce absorbancias de 0 a

Para el cálculo de los resultados se tiene en cuenta los valores standards obtenidos con una mezcla de aminoácidos conocidos en concentración de 0,1 mol/ml. y frente a las curvas resultantes se aplica la fórmula:

$$\frac{W H f \quad (\text{problema})}{W' H' f' \quad (\text{standard})}$$

Donde W representa la frecuencia, H la altura y f el factor de corrección para cada aminoácido.

.../

Los resultados finales se expresan bien en % respecto al total de aminoácidos o bien en mg. de cada aminoácido por gramo de planta.

e. Extracción de sustancias reductoras y sustancias de naturaleza péctica.

El proceso de extracción que hemos admitido como más eficaz para obtener las sustancias reductoras, que contiene el tejido vegetal, es el que señala Inman (55), que utiliza etanol de 80%. El material a estudiar se tritura finamente y se extrae con un volumen de etanol correspondiente a cinco veces su peso, esta operación se repite cuatro días sucesivos y los extractos obtenidos se mezclan, y se tratan con carbón activo, para clarificar, se utiliza 1 g. de carbón por g. de peso fresco de tejido vegetal; este tratamiento tiene lugar en la oscuridad, con agitación durante 15 minutos. El líquido transparente que resulta, se neutraliza para concentrarlo 40 veces en un rotavapor R. Büchi a 40° en vacío. La muestra resultante, neutralizada, se emplea para determinar las sustancias reductoras que contiene el material vegetal utilizado. Hemos de destacar que la pulpa resultante del tratamiento inicial con etanol, se conserva para obtener a partir de ella las sustancias

.../

de naturaleza péctica que se determinarán más adelante.

Dicha pulpa, una vez evaporado todo el alcohol, se trata con una mezcla etanol-eter (V/V) primero, y despues, solamente con eter, se prensa y a continuación se suspende en agua en la proporción de 50 ml. por gramo de material seco. Se agita durante 5 a 6 horas a 20°C y se añaden unos gramos de arena para facilitar la extracción total.

El residuo se resuspende en ClH 0,025 N y se calienta en B.M. a 60°C durante 2 horas sin dejar de agitar periodicamente. Este tratamiento se repite de 2 a 3 veces para mezclar por último todos los extractos y emplearlos así en la determinación de las sustancias pécticas.

i) Valoración de grupos reductores.

Se lleva a cabo por el método de Somogyi & Nelson. A una muestra del problema, que contiene 1 g. fresco de material vegetal, se añade 1 ml. de reactivo Somogyi, se agita y se introduce en B.M. hirviendo durante 15 minutos. Despues de enfriar, se agrega 1 ml. de reactivo Nelson, se agita y se lleva hasta 10 ml. con agua destilada. Seguidamente se lee a 520 m μ en un espectrofotómetro Unicam SP 500 series 2.

.../

Los resultados se llevan sobre una curva patrón de glucosa con límites comprendidos entre 10 y 600 mg. y se expresan en mg. de glucosa por gramo de planta fresca.

ii) Valoración de sustancias pécticas.

Hemos escogido la técnica descrita por Mc Comb & Mc Cready (80) por ser la que da resultados más claros y de mejor interpretación.

En tubos de ensayo, sumergidos en un baño de hielo, se mezclan 2 ml. de la muestra con 12 ml. de SO_4H_2 concentrado. Después de homogeneizar, se calienta en B.M. hirviendo durante 10 minutos. Se dejan enfriar a temperatura ambiente y cuando han alcanzado los 20 - 25°C se añade 1 ml. de carbazol disuelto en stanol al 0,15%.

Se miden exactamente 25 minutos antes de proceder a su lectura en un Spectrofotómetro Unicam SP 500 series 2, a 520 nm.

Los resultados se calculan sobre una curva patrón construida, bien con ácido monogalacturónico, o bien con pectina de manzana entre los valores de 10 a 100 gr. Se expresan en mgr. de estos compuestos por gramo de planta fresca.

f. Extracción de proteínas y nitrógeno libre.

Con el fin de eliminar las sustancias grasas de la planta que puedan

interferir más tarde en la determinación proteica, se practican, según lo indica Steward (124) tres extracciones con eter de petróleo a partir de una cantidad conocida del material vegetal previamente triturado en mortero a 42C. La proporción que se emplea es de 4 ml. de líquido extractante por 1 g. de planta. La fracción líquida se separa por filtración y se desecha mientras que con la fracción de tejido resultante empezamos la verdadera extracción de proteínas, según el método que describen Heitefuss y col. (50).

A la pulpa obtenida en el paso anterior se añade tampón fosfato 0,05 M a pH 7,5 (1,5 ml. por gramo de planta) y se deja homogeneizar durante 12 a 24 horas a 42C, para despues pasar por doble gasa y prensar. Así se obtiene un extracto líquido que centrifugamos a 17.000 g. durante 30 minutos, a 42C. El sobrenadante se congela en una mezcla de hielo + alcohol y despues de fundir se centrifuga de nuevo 20 minutos a 42C y 20.000 g.

Del sobrenadante recogido se separa una muestra para la determinación de nitrógeno, según indicaremos en el apartado correspondiente.

El líquido restante se dializa en el medio de extracción durante 24 horas, al cabo de las cuales, se recoge y se vuelve a cenfrifugar

20 minutos a 20.000 g. y 42C.

El sobrenadante así obtenido se emplea directamente en la valoración de material proteico, o bien, se conserva a 202C hasta el momento de su empleo.

1) Determinación de proteína.

Si el extracto que vamos a usar, obtenido como ya hemos indicado no es totalmente incoloro, pueden surgir interferencias en la lectura con espectrofotómetro.

Para evitarlo, hemos recurrido a dos métodos distintos, de analogos resultados. Uno es el indicado por Steward (124) que consiste en pasar dicho extracto por columna de Sephalex G-75 (12 X 1,50 cm) empleando como eluyente el mismo tampón de extracción.

El segundo consiste en tratar la muestra con carbón activo en la proporción de 1 gramo de carbón por gramo de tejido fresco, en agitación y oscuridad durante 15 minutos a 42C. Seguidamente se filtra por papel Whatman nº 1 y el líquido ya incoloro se lleva al espectrofotómetro para realizar la lectura de proteínas a 260 y 280 m μ según el método descrito por Layne (75), mediante el empleo de una curva patrón obtenida a partir de albúmina bovina.

.../

Los resultados se expresan en mg. de proteína por gramo de peso fresco de planta.

ii) Determinación de nitrógeno libre.

Se emplea la muestra que hemos indicado en el apartado 8. donde se describe la técnica seguida para extraer el material proteico del tejido vegetal. En ella la valoración del nitrógeno total se hace por el procedimiento clásico de Kjendahl.

El amoniaco procedente de la destilación, despues de haberse eliminado totalmente el CO_2 y la materia orgánica que pudiera existir en la muestra, se recoge en ClH 0,01 N y se valora con NaOH 0,01 N, como indicador hemos empleado el rojo de metilo.

Con objeto de obtener valores medios que puedan ser luego expresados en tanto por ciento de nitrógeno respecto al peso en gramos del tejido vegetal utilizado, se valoran tres volúmenes distintos de la muestra que corresponden a cantidades, en peso, diferentes de la misma.

9. Análisis enzimático del tejido vegetal.

a. Extracción de material activo.

El método que se ha seguido es el descrito por Swinburne (125).

.../

Todas las operaciones se realizan a 4°C de la forma siguiente:

El material de planta fresco, se pesa y se mezcla con igual cantidad (p/v) de ClNa 0,25 N y, después de triturar en mortero, se deja en maceración 16 horas. Luego se centrifuga a 3.000 r.p.m. 20 minutos. El sobrenadante se dializa en agua durante 24 horas, para centrifugar de nuevo y guardar el líquido final en congelador hasta el momento de su uso.

i) Determinación de PG.

La técnica de Jansen y Mc Donnell (57) que hemos explicado anteriormente, al referirnos a las enzimas producidas por el patógeno, es la que también vamos a seguir en este caso, si bien, el material enzimático se incorpora aquí en forma de extracto vegetal en la proporción de 0,25 g. de planta por 20 ml. de la mezcla de incubación. Los resultados se expresan en mg. de ácido monogalacturónico por gr. de peso fresco de planta.

ii) Determinación de PATE Y PTE.

Como en el apartado anterior, aquí también seguimos idénticos métodos a los explicados en el caso del microorganismo patógeno, E. carotovora (88) e, igualmente, el producto enzimático se añade en la forma de extracto vegetal en la proporción de

.../

0,25 gr. de planta por 10 ml. de la mezcla de incubación.

Los sustratos empleados son ácido péctico para PATE y pectina para PTE, y las lecturas en espectrofotómetro se hacen respectivamente a 230 y 235 m μ

III. RESULTADOS

III - RESULTADOS

=====

A. - OBSERVACION MICROSCOPICA SOBRE LA MORFOLOGIA DEL MICROORGANIS MO PATOGENO ERWINIA CAROTOVORA Y SOBRE LA HISTOLOGIA DE LA PLANTA HUESPED PHASEOLUS VULGARIS L.

a. Morfología de Erwinia carotovora.

Las observaciones microscópicas revelan la aparición de formas anormales de *Erwinia carotovora* bajo determinadas condiciones. Estas formas pueden verse tanto en el microscopio ordinario como en el electrónico. Por ser las preparaciones sombreadas del microscopio electrónico las que muestran más perfección de detalle, vamos a referirnos a ellas, de manera especial.

En primer lugar, presentamos (fig. 1) la morfología típica de *E. carotovora*, para que nos sirva de testigo ante las irregula

.../

ridades que vamos a señalar.

1. Influencia del NO_3K , $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$
y SO_4Mg .

Debemos hacer notar que la presencia de NO_3K en el medio, cuando se encuentra en cantidades inferiores a 4%, no decide ninguna alteración visible en la morfología de E. carotovora, pero a partir de esta concentración de 4% determina un bloqueo en los procesos de tabicación, que conduce a la aparición de formas alargadas, ante la imposibilidad de separarse las nuevas individualidades que van surgiendo en el proceso de división. La fig. 2 ofrece un aspecto de estas alteraciones. Cuando la concentración de NO_3K alcanza valores por encima de 4,5% los cambios morfológicos se intensifican y aparecen formas esféricas que pierden su contenido plasmático y odrecen el aspecto que presenta la fig. 3.

Algo semejante a lo que acabamos de indicar en el caso de NO_3K , ocurre cuando la sal que se incorpora al medio es $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$. En la fig. 4 podemos ver el aspecto que presenta la bacteria E. carotovora cuando la cantidad de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ incorporado a su medio de cultivo es de 1,25%. Puede observarse el alargamiento que muestra y la iniciación de división celular

que no llega a completarse como consecuencia de las alteraciones provocadas por la sal añadida al medio. Estas formaciones filamentosas evolucionan, como en el caso de la sal potásica, hasta presentar aspecto de bacilos larguísimos que pierden su contenido y quedan como formas vacías de paredes plegadas y rugosas.

Si observamos las muestras, que corresponden a los cultivos de E. carotovora procedentes de medios con 3, 7 y 10% de SO_4Mg , nos encontramos sorprendentemente con que la morfología de la bacteria no revela ninguna de las alteraciones que hemos señalado en los casos anteriores. La fig. 5 nos presenta el aspecto de la bacteria que ha evolucionado en presencia de 10% de SO_4Mg , sin que se aprecie ninguna deformación que pueda atribuir a este compuesto una acción similar a la que hemos visto producir, incluso a concentraciones inferiores, el NO_3K y $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$. Se puede, por consiguiente, admitir una influencia cualitativa dominante por parte de las sales probadas que se impone a las posibles modificaciones atribuibles a fuerzas de carácter osmótico.

.../

Fig 1.- Forma normal de Erwinia carotovora (x 54.000)

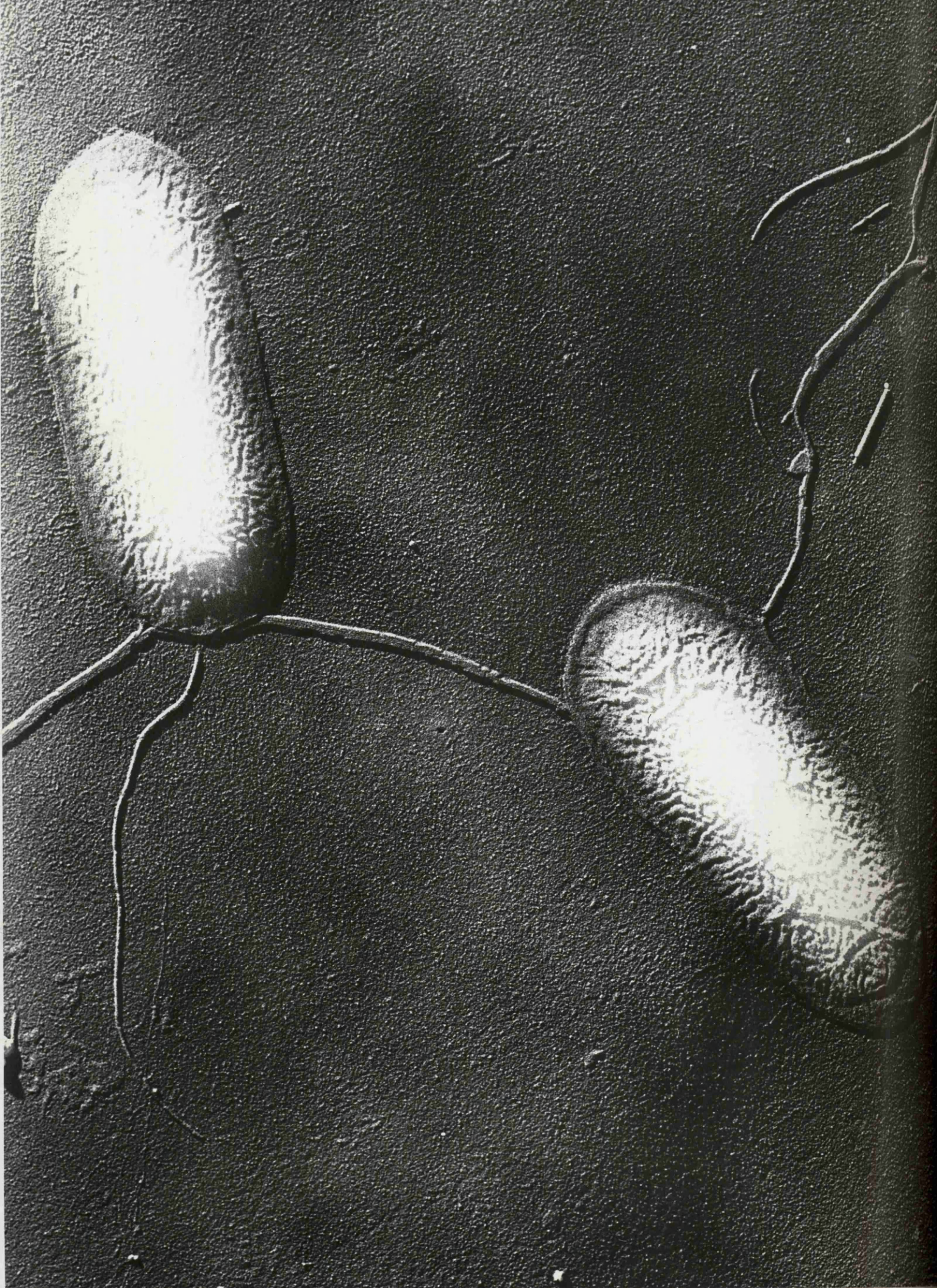


Fig. 2.- Formas alargadas de Erwinia carotovora
inducidas por 4% de NO_3K (x 40.300)



Fig. 3. - Aspecto de Erwinia carotovora cultivada en presencia de NO_3N al 4, 5% (x 75.500).



Fig. 4. - Formas anormales de Erwinia carotovora
provocadas por $1,25 \times 10^8$ de $(H_2O)_2Ca$.
(x 54.000).



Fig. 5.- Erwinia carotovora desarrollado en presencia de
10% de CO_2Mg . ($\times 66.000$).



b. Histología de Phaseolus vulgaris. L.

Debido a la influencia que el contenido en agua y el pH de un tejido pueden ejercer sobre la estructura del mismo, hemos pasado a considerar ambos factores antes de proceder al estudio histológico del vegetal.

1. Grado de humedad y pH.

Como es sabido, los tejidos vegetales presentan en su composición un elevado porcentaje de agua. Esto es de suma importancia en el desarrollo de la planta, tanto por su papel estructural como por servir de medio de transporte de nutrientes. Por ello, hemos analizado su contenido en los tejidos de Ph. vulgaris L. antes y después de ser infectados por E. carotovora. En plantas sanas se halló un 89% de humedad, mientras que en las plantas que sufren la enfermedad causada por la bacteria, dicha humedad se reduce a un 77,7%.

Los distintos niveles de potasio, calcio y magnesio en el vegetal no parecen influir mucho en su contenido acuoso ya que los valores que se obtienen son muy semejantes a los que acabamos de presentar, por lo que no estimamos necesaria su exposición en este caso.

.../

Los diferentes grados de nutrición mineral en que crecen y se desarrollan las plantas de Ph. vulgaris L. no determinan cambios sustanciales de pH. según los resultados que se expresan a continuación:

Judía sana pH 6,5

Judía enferma pH 7,2

2. Diferenciación al microscopio.

En las preparaciones histológicas de tallos sanos de judía se aprecian perfectamente las distintas estructuras coloreadas específicamente. La epidermis, corteza y tejido medular muestran sus células poliédricas con escasos espacios intercelulares y teñidas de un verde intenso, en contraste con el rojo que domina en el tejido vascular (fig. 6).

Cuando este tallo sufre la infección de E. carotovora, mediante inyección en su zona medular, podemos ver en la fig 7 la desaparición de las paredes en las células de dicha zona, con lo que su contenido plasmático es utilizado por la bacteria, dando lugar así a la formación de espacios vacíos que van agrandándose a medida que avanza la infección. En la figura indicada, se observa

.../

la casi total desaparición de esta región medular, cuyos escasos restos se encuentran limitados por los elementos del sistema conductor, que aparecen como la barrera de separación con la zona cortical.

Además del tallo, hemos utilizado las hojas de judía para observar la degradación de sus tejidos por E. carotovora. En las figs. 8 y 9 presentamos un corte transversal que muestra la estructura bifacial del mesófilo foliar y del nervio medio. Puede verse la distribución de las células que forman la epidermis superior e inferior, así como los tejidos en empalizada y esponjoso, con los espacios intercelulares que le dan un aspecto reticular. Los elementos conductores (fig. 8) aparecen claramente definidos en el corte a nivel del nervio medio de la hoja.

Cuando esta hoja aparece con lesiones producidas por E. carotovora su aspecto es el que nos muestran las figs. 10 y 11. En la primera de ellas se destaca la zona del nervio medio donde claramente se ve la desorganización de todo el parenquima e incluso de la epidermis. Las células han perdido su estructura bajo el ataque de la bacteria y aparecen como una masa informe, blanda, donde solo la zona central conserva el recuerdo del sistema conductor. El limbo de esta misma hoja es una prolongación de los síntomas descritos; las pa-

.../

redes celulares del mesofilo han sido destruidas, el contenido celular utilizado por la bacteria, los espacios intercelulares se agrandan paulatinamente y como consecuencia de las reacciones químicas que se suceden aparecen elementos nuevos capaces de fijar safranina, dando un aspecto totalmente diferente al de la fig. 9 que representa el limbo de hoja sana.

Fig. 6. - a) Corte transversal de tallo de Phaseolus
vulgaris L. (x 126).

Fig. 6. - b) Detalle de la Fig. anterior (x 200).

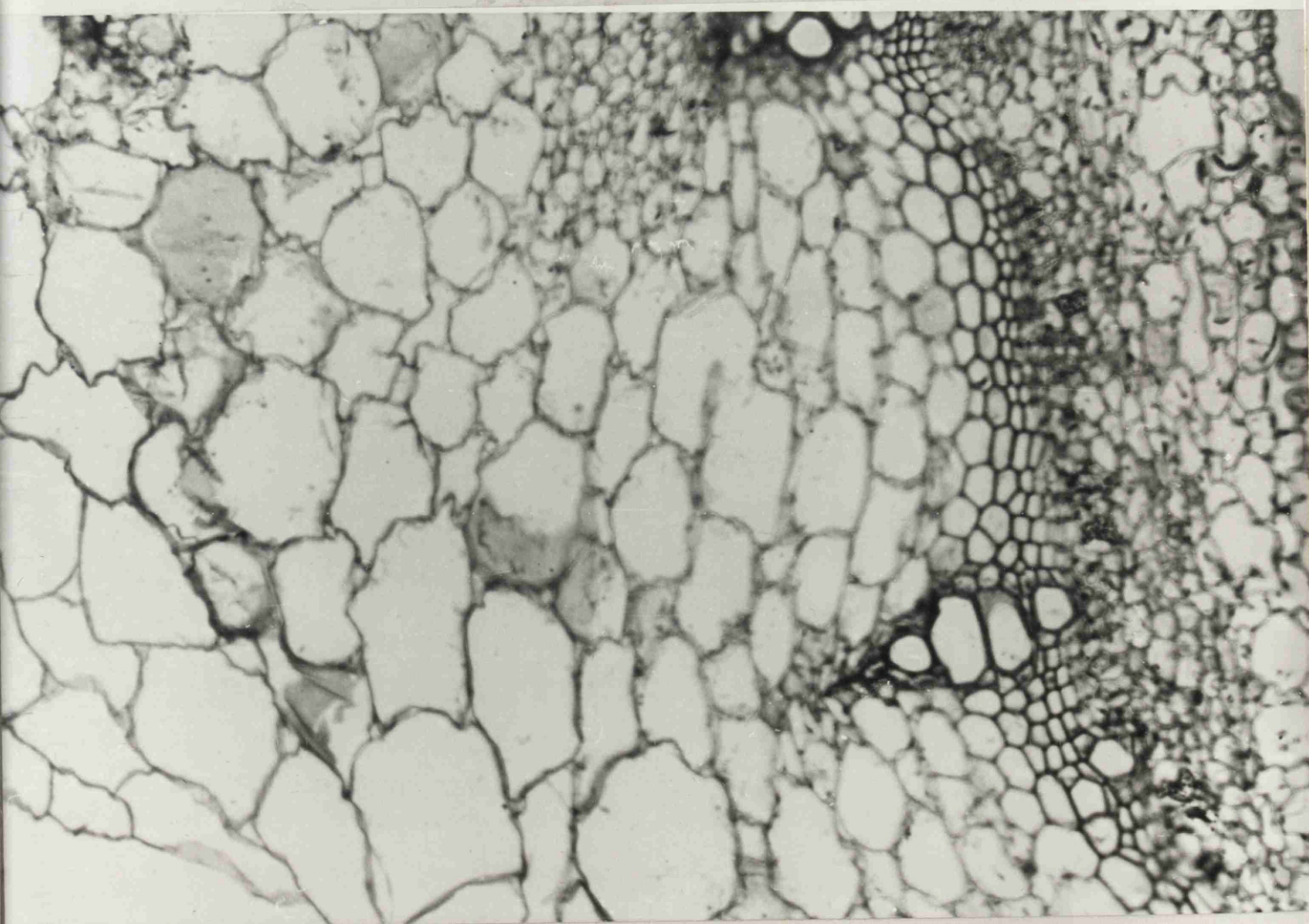
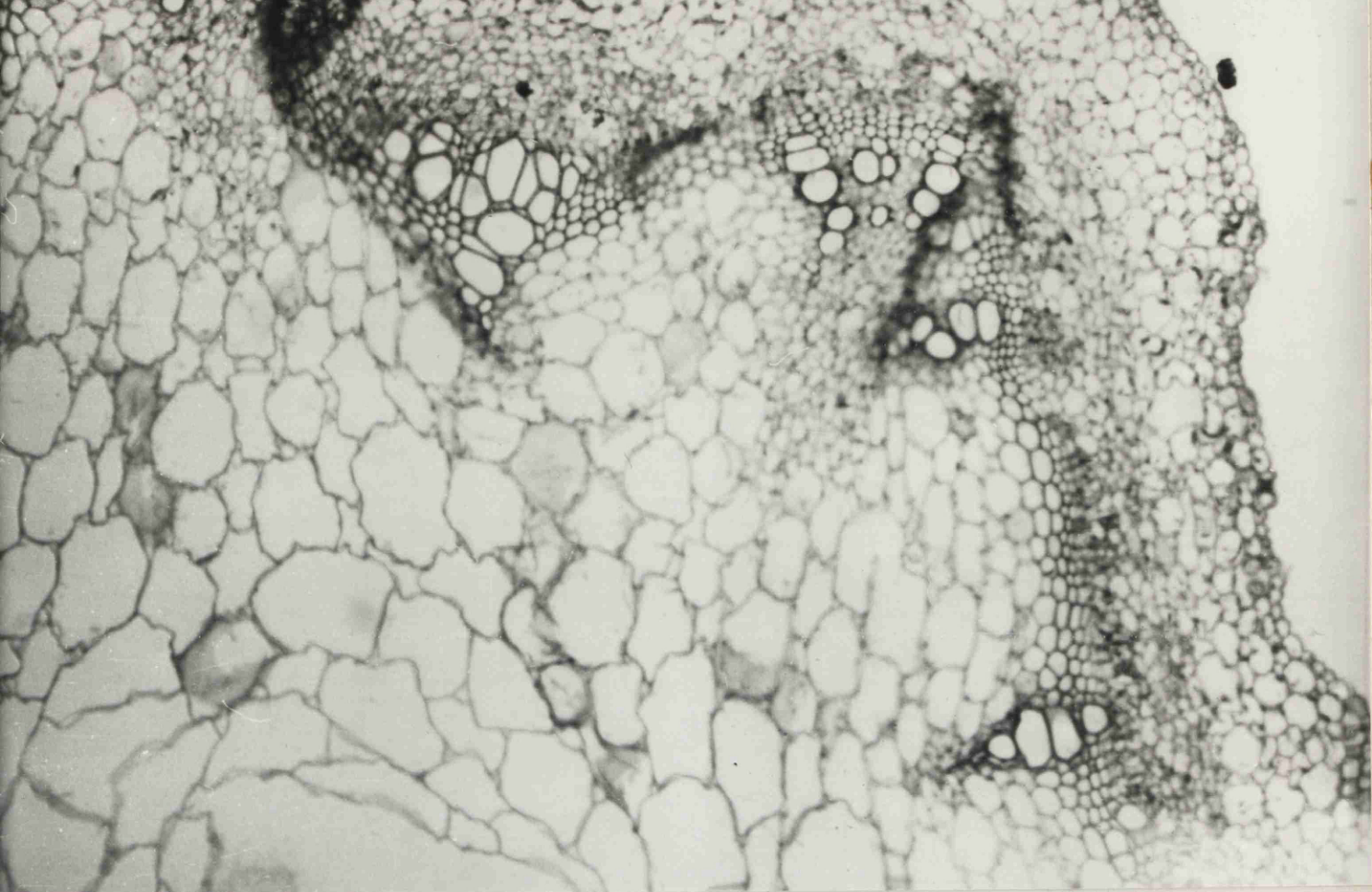


Fig. 7. - a) Corte transversal de tallo de Phaseolus vulgaris L. atacado por la acción de Erwinia carotovora (x 200).

Fig. 8. - b) Estado avanzado en la destrucción del tallo de Phaseolus vulgaris L. por Erwinia carotovora (x 200).

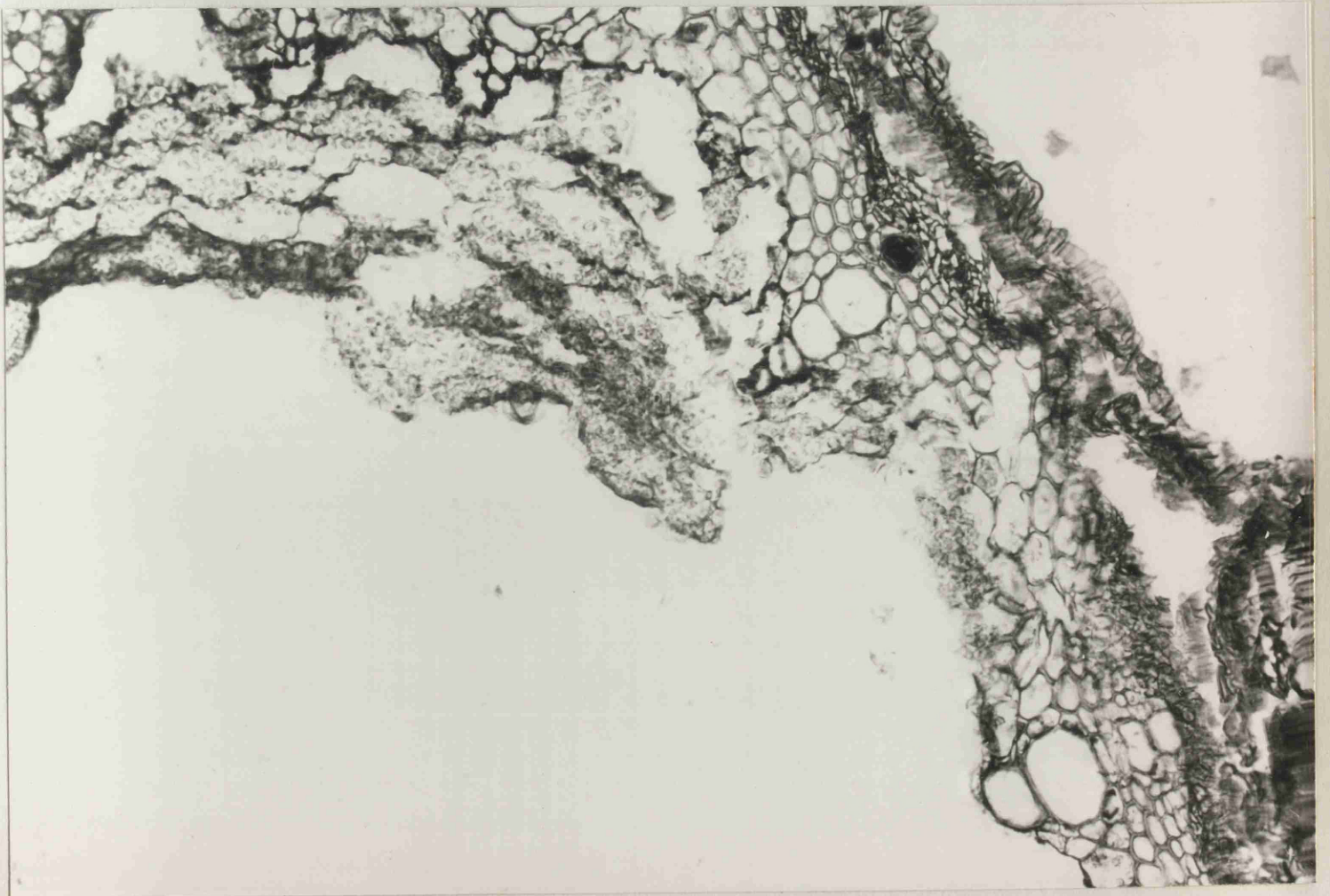
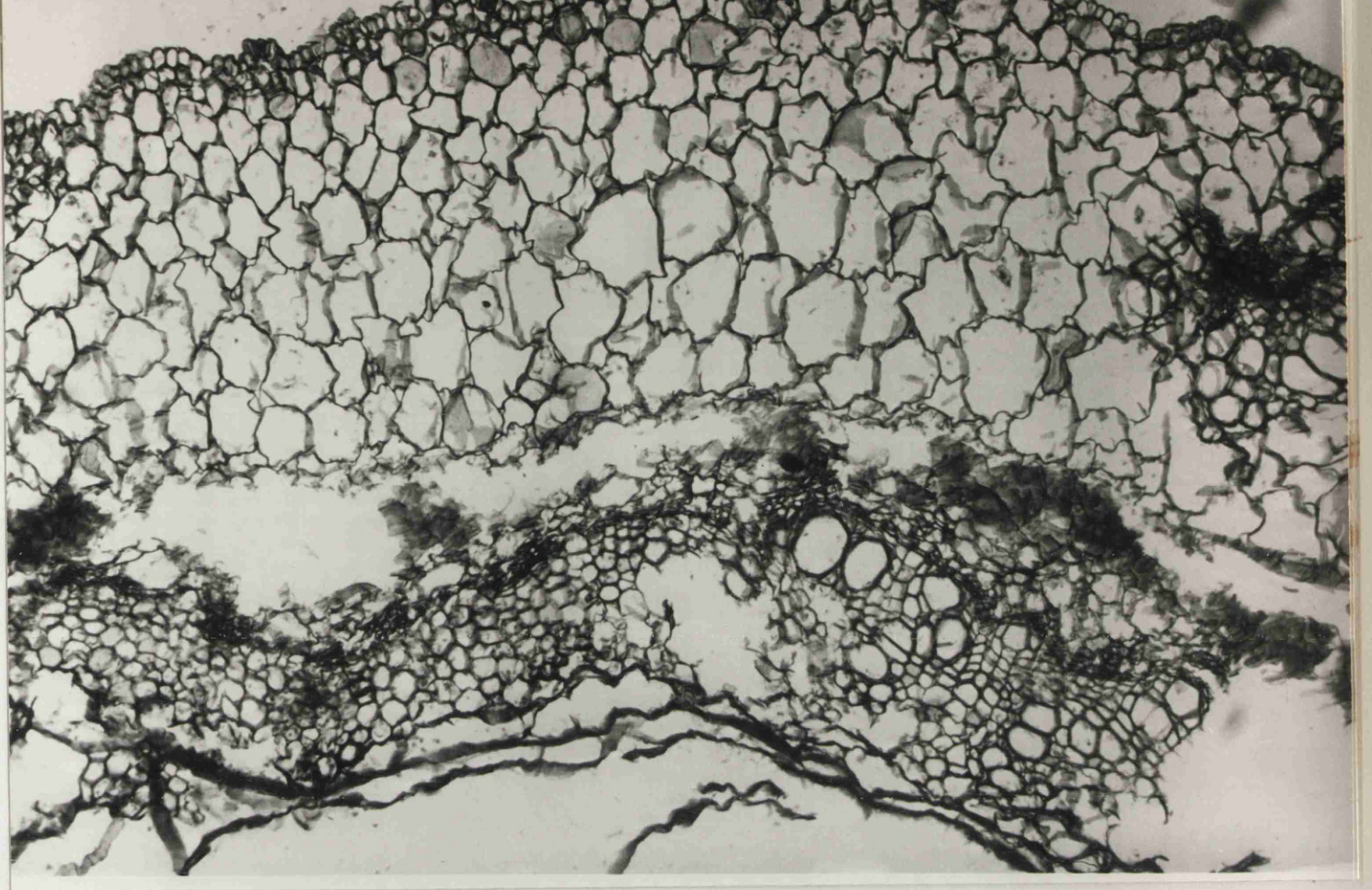


Fig. 1.- Corte transversal de hoja de Phaseolus vulgaris
L. a nivel de su nervio medio (x 126).

Fig. 2.- Corte transversal del limbo de Phaseolus
vulgaris L. (x 126).

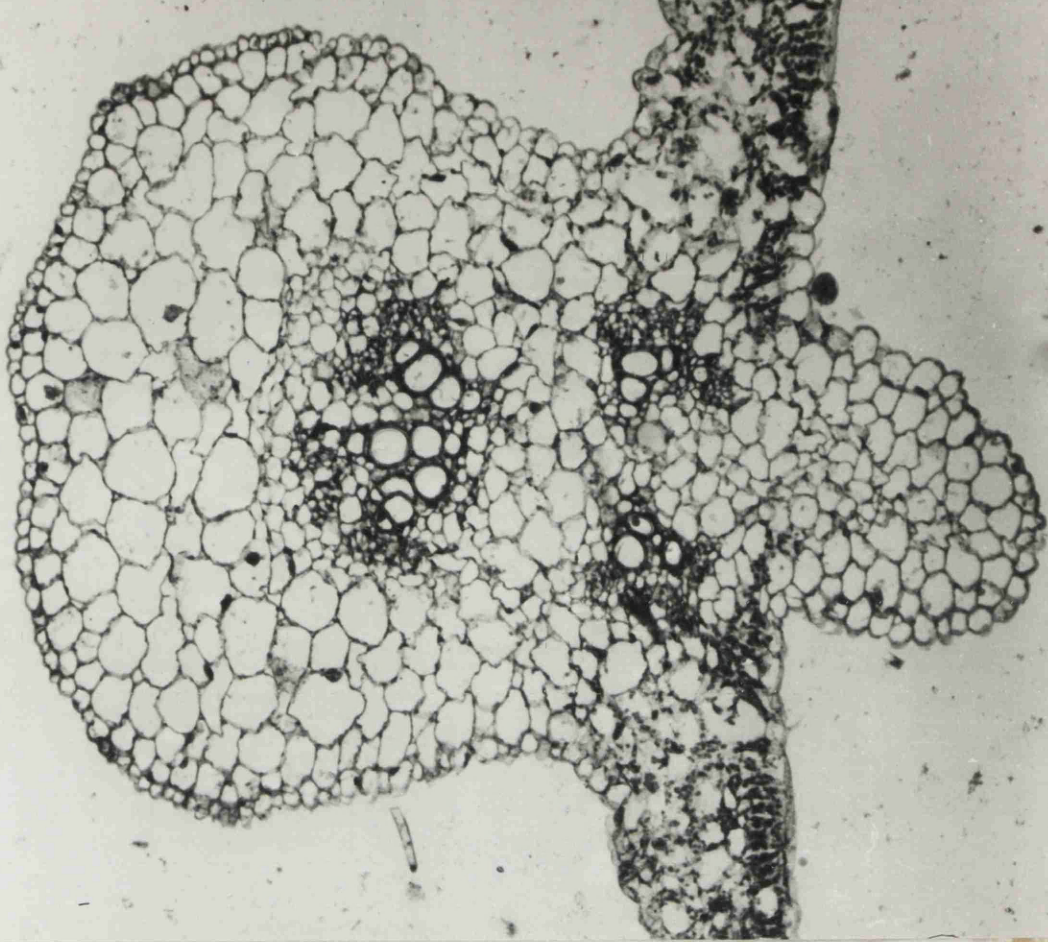
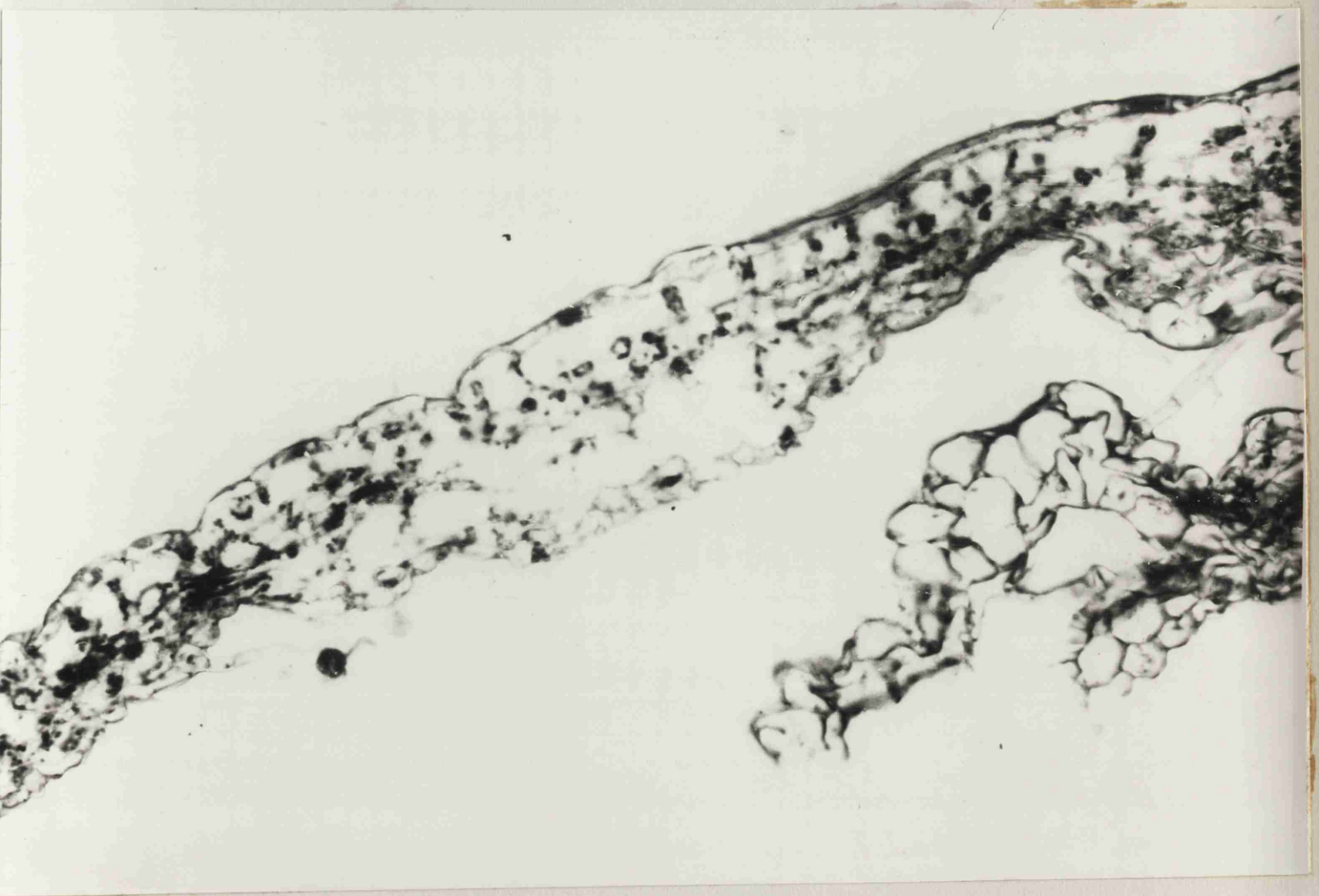
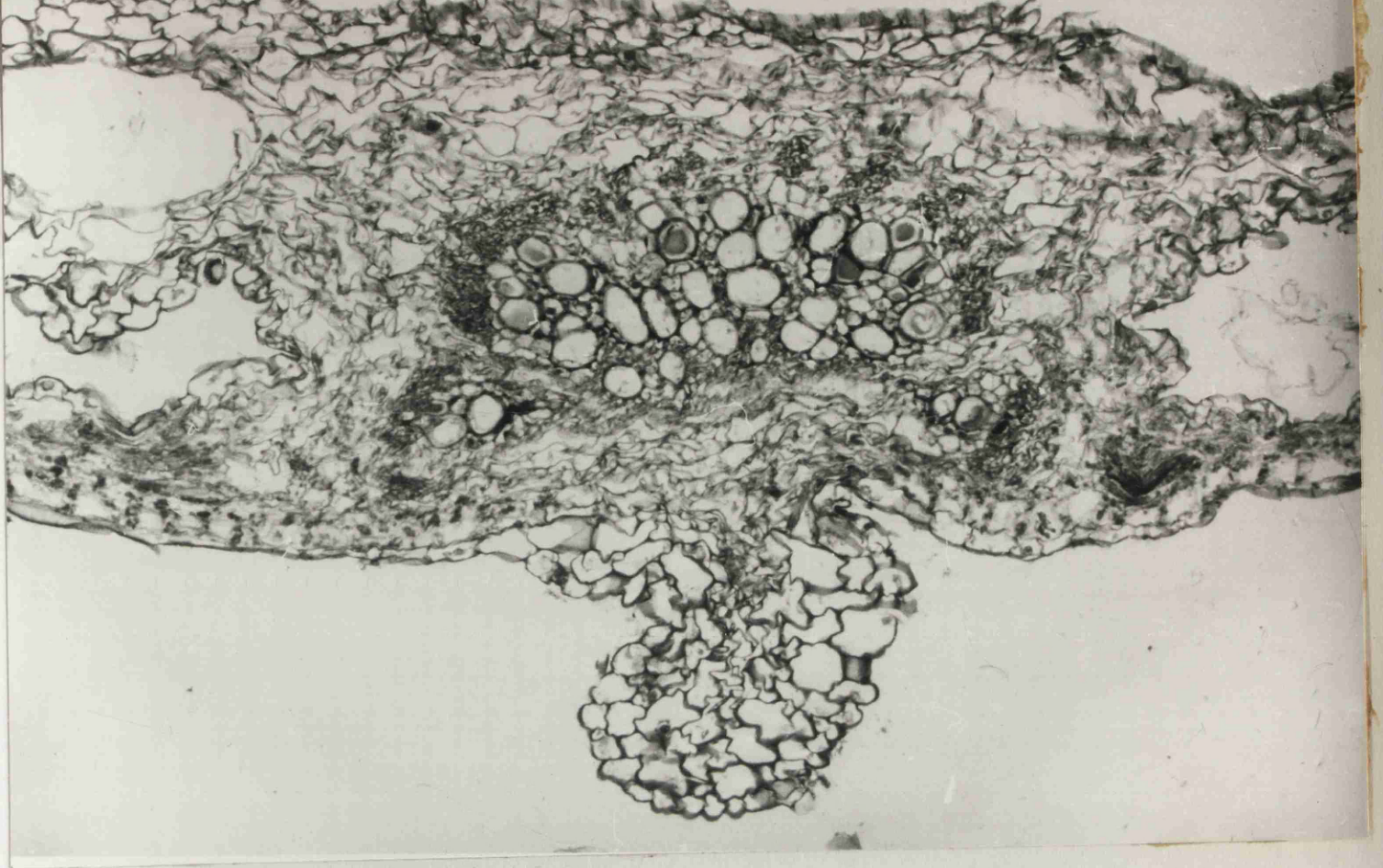


Fig. 10.- Corte transversal a nivel del nervio medio de
hoja de Phaseolus vulgaris L. infectada por
Erwinia carotovora (x 125).

Fig. 11.- Corte transversal del limbo de Phaseolus vulgaris
L. destruido por la acción de Erwinia carotovora
(x 200).



**B. INFLUENCIA DEL ION K^+ SOBRE EL
MICROORGANISMO PATOGENO.
ERWINIA CAROTOVORA.**

a. Crecimiento.

El crecimiento bacteriano en el medio y condiciones que hemos descrito en el apartado correspondiente, tienen lugar en la forma que se presenta en la fig. 12, por la que vemos que el NO_3K ejerce un efecto inhibitor en el desarrollo de E. carotovora, que si bien para bajas concentraciones no es muy marcado, se agudiza conforme estas aumentan hasta llegar a una inhibición casi total que corresponde al 5% de NO_3K en el medio.

b. Síntesis de enzimas pectolíticas.

E. carotovora produce diversas enzimas pécticas, entre las que se encuentran poligalacturonasa (PG), pectatotranseliminasa (PATE) y pectintranseliminasa (PTE), que son las que hemos determinado.

1. En el caso de PG, según indica la fig. 13, el aumento de potasio en el medio lleva paralelamente a una disminución de la actividad enzimática hasta anularla por completo a partir del 5% de NO_3K en el medio.

2. El efecto del potasio sobre PATE es menos marcado, sin que le afecten concentraciones inferiores a 3%. A partir de este valor la

.../

inhibición que aparece es poco intensa y aumenta de manera suave a medida que lo hace el NO_3K . Cuando esta sal alcanza el 6% en el medio, la actividad PATE se ha reducido un 50% del valor correspondiente al testigo, que crece en el mismo medio sin NO_3K (fig. 14).

3. De forma contraria a lo observado en los dos casos anteriores, el NO_3K inhibe la actividad PTE, con distinta intensidad, cuando su concentración es inferior a 4%, siendo de resaltar que la máxima inhibición corresponde a las dosis más pequeñas. Por encima del 4% su efecto es nulo o ligeramente estimulante, incrementando la actividad PTE en solo un 10% cuando la concentración de NO_3K alcanza el 5% (fig. 15).

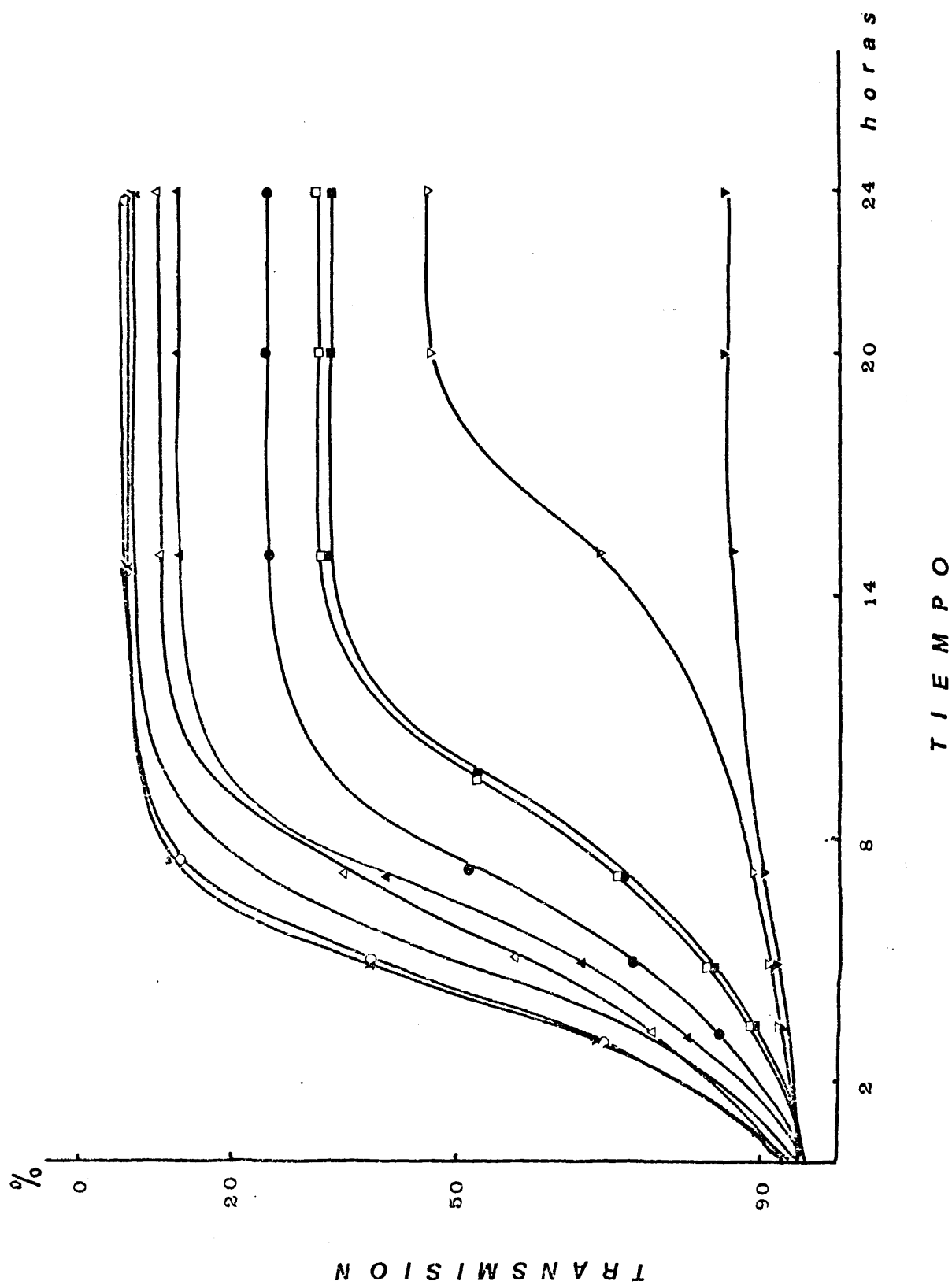


Fig. 12.- Efecto de la presencia de NO_3K en el crecimiento de E. carotovora.

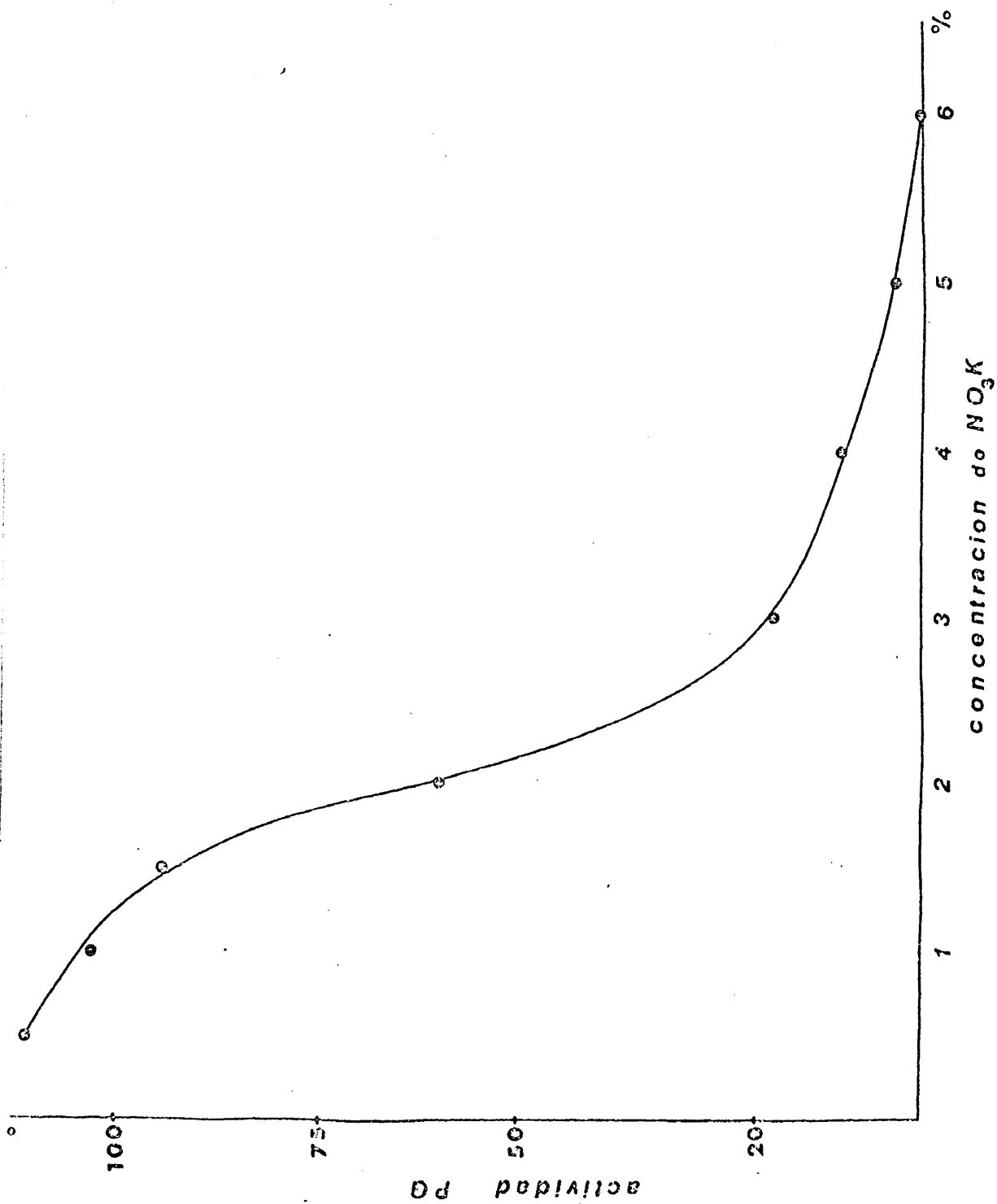


Fig. 13. - Efecto del NO_3K en la síntesis de PG, por E. carotovora.

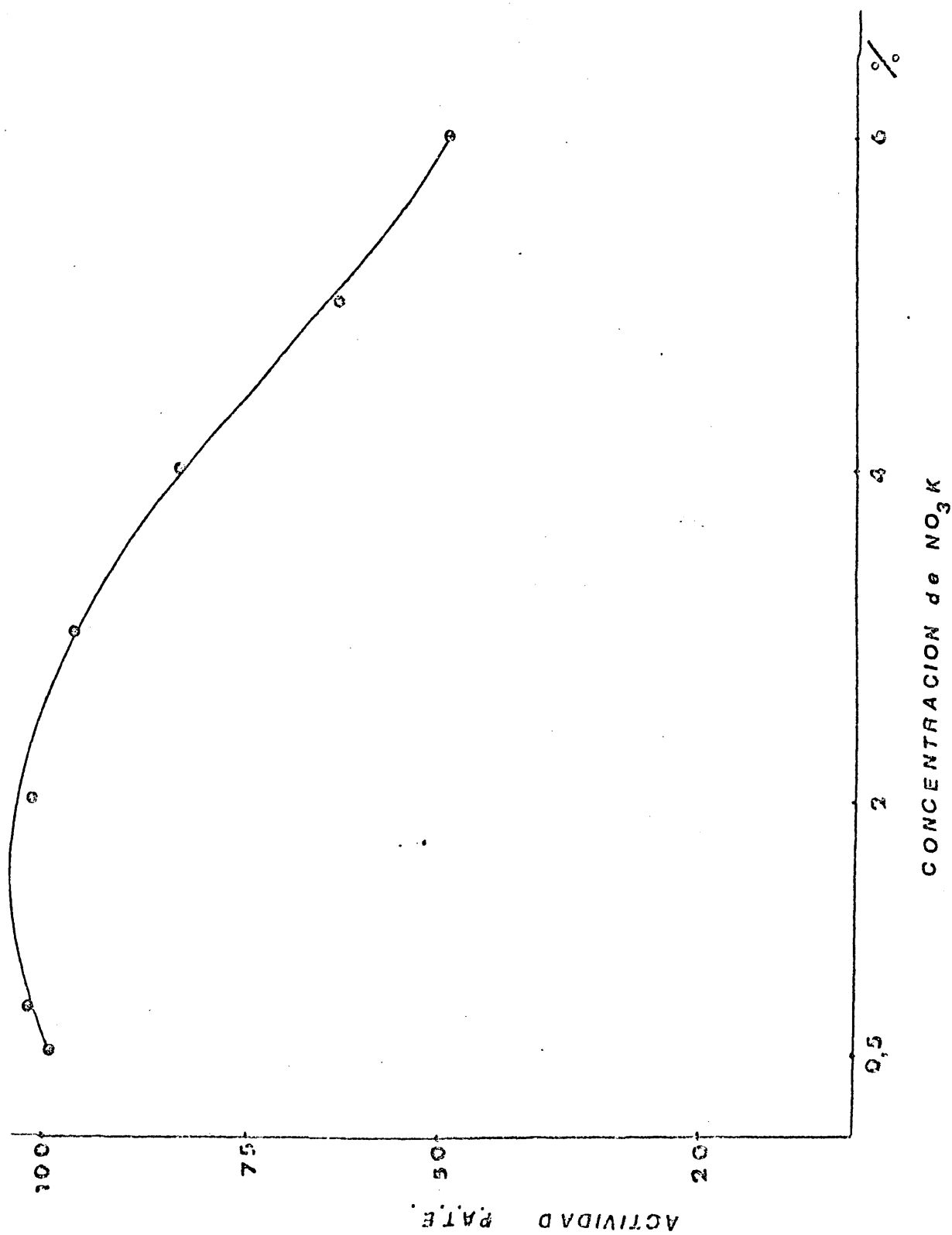


Fig. 14. - Efecto del NO_3K en la síntesis de PATE, por E. carotovora.

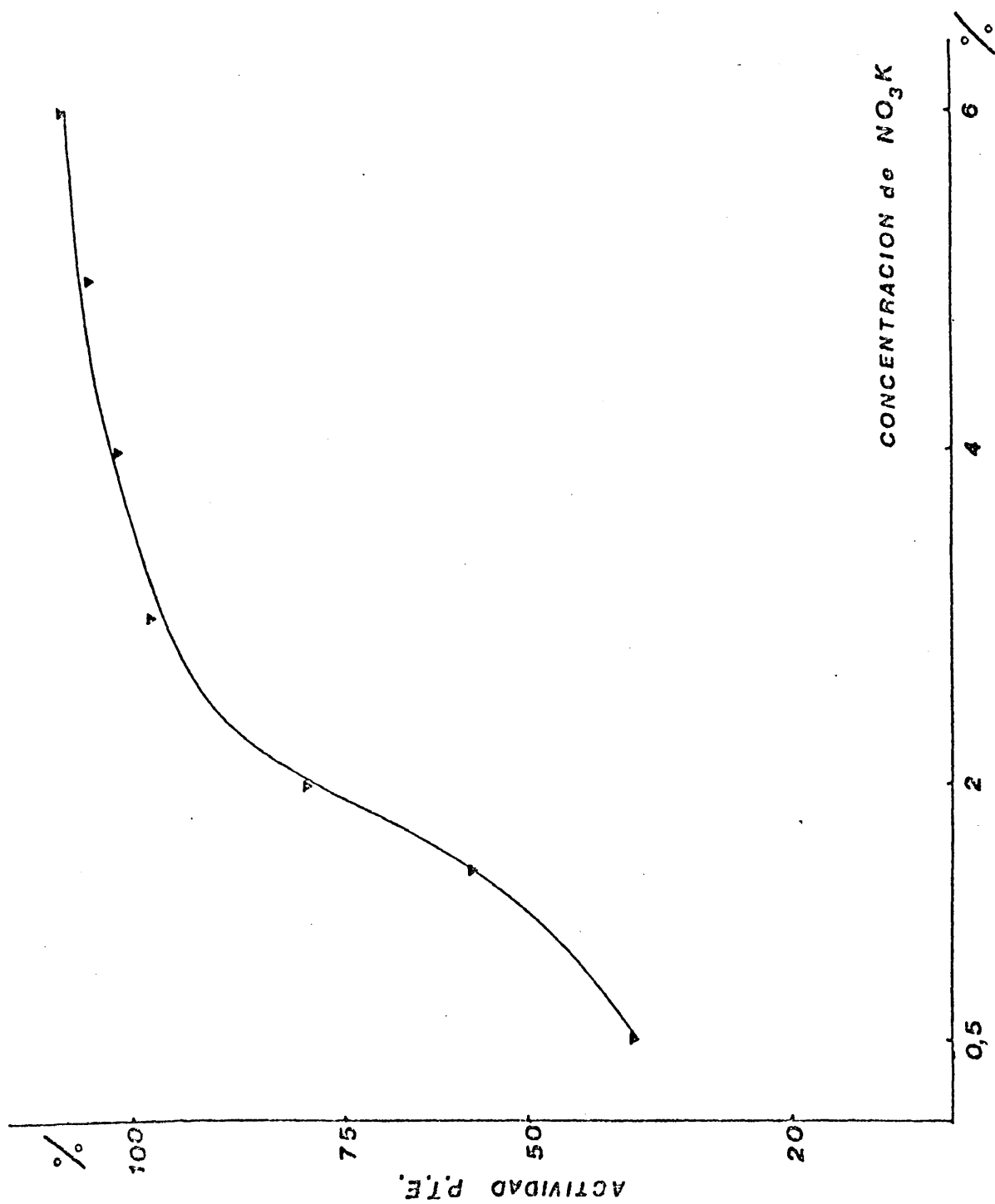


Fig. 15.- Efecto del NO_3K en la síntesis de PTE,
por E. carotovora.

C. - INFLUENCIA DEL ION K^+ SOBRE LA PLANTA
HUESPED PHASEOLUS VULGARIS L.

a. Crecimiento.

El hecho de que las semillas de Phaseolus vulgaris se desarrollen en medios que contienen concentraciones distintas de NO_3K (de 0 a 15×10^{-3} M) no parece influir de manera definitiva en el grado de evolución de la planta, según se observa en la fig. 16, que presenta el aspecto general a los 15 días de permanencia en invernadero. Como puede verse, apenas hay diferencia entre las distintas macetas que crecen casi por igual con independencia de sus disponibilidades en sales de potasio.

Pese a esta identidad de desarrollo, puede señalarse alguna notable diferencia en su composición química, diferencia que puede ser responsable de su comportamiento frente a la bacteria patógena E. carotovora.

b. Sensibilidad a la infección.

Las plantas que acabamos de describir toman el aspecto que nos presenta la fig. 17 a los dos días de ser inoculadas con la bacteria Erwinia carotovora.

La planta carente de potasio, así como la que contiene este elemento en la proporción nutritiva normal, manifiestan una gran susceptibilidad a la infección por la bacteria. Sin embargo,

Fig. 16.- Aspecto de plantas de Phaseolus vulgaris L. desarrolladas sobre distintas concentraciones de NO_3K (de izq. a dcha.: 0; 2×10^{-3} ; 4×10^{-3} ; 8×10^{-3} y $15 \times 10^{-3}\text{M}$).

Fig. 17.- Plantas tratadas con distintas concentraciones de NO_3K , e inoculadas con Erwinia carotovora (de izq. a dcha.: 0; 2×10^{-3} ; 4×10^{-3} ; 8×10^{-3} y $15 \times 10^{-3}\text{M}$).



dicha susceptibilidad empieza a disminuir a medida que la concentración de potasio se hace mayor en el medio. En el valor de $8 \times 10^{-3}M$ comienza ya a iniciarse una reacción de resistencia al patógeno y así al alcanzar el nivel de $15 \times 10^{-3}M$, ésta aparece de forma total y definitiva por lo que los síntomas propios de la enfermedad no se hacen patentes.

c. Absorción de potasio, calcio y magnesio.

Los análisis que hemos realizado para valorar el potasio incorporado a los tejidos de las distintas plantas, indican que su contenido en el medio nutritivo condiciona su absorción y utilización por el vegetal. Por encima de concentraciones de NO_3K correspondientes a $6 \times 10^{-3} M$ el potasio retenido en los tejidos no aumenta, aunque lo haga la molaridad de esta sal en la solución de riego de la planta (fig. 18).

En la misma figura podemos advertir como la absorción de calcio por los tejidos se ve ligeramente influenciada, en sentido inverso, por el potasio, puesto que al aumentar el potasio en el medio disminuye el calcio en la planta.

En cuanto a la concentración de magnesio en el vegetal, no parece que esté determinada por sus disponibilidades en potasio, ya que

.../

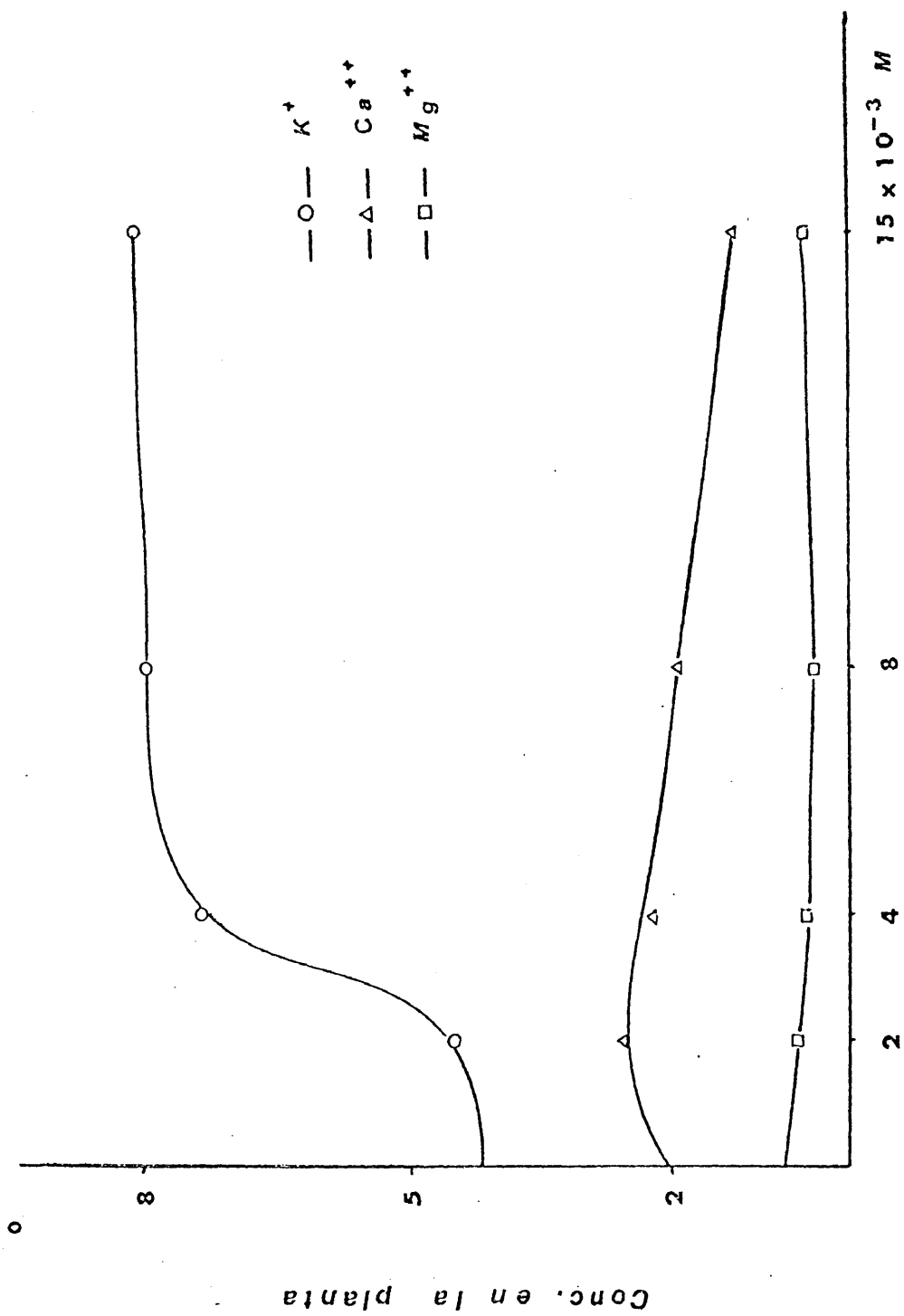


Fig. 18.- Contenido en potasio, calcio y magnesio en las plantas desarrolladas en medios con concentraciones crecientes de NO_3K .

se mantiene practicamente en el mismo nivel a lo largo de toda la experiencia, aunque las oscilaciones de NO_3K alcanzan valores significativos.

d. Contenido en compuestos orgánicos.

1. Azúcares libres.

Los resultados que se han obtenido por medio de las técnicas cromatográficas nos indican la existencia de lactosa, sacarosa, glucosa, levulosa y xilosa, como azúcares libres en los tejidos de Phaseolus vulgaris L. El potasio según puede verse en la fig. 19 parece que influye en el sentido de disminución de su contenido en la planta, es decir, a mayor potasio, menor concentración de azúcares. Esta indicación se deduce de la intensidad en el tono de las manchas, basandonos en estar igualadas todas las concentraciones de las muestras que se cromatografían.

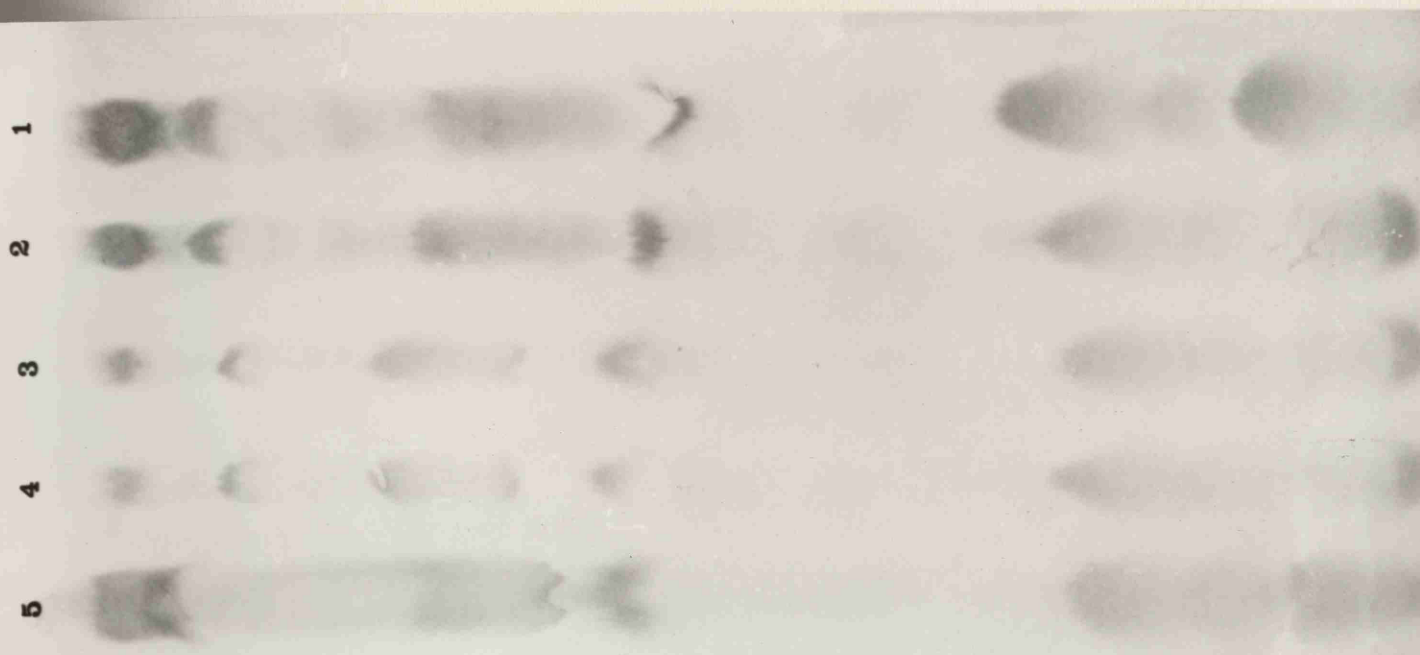
Estos análisis realizados a partir de plantas como las anteriores, pero despues de haber sido inoculadas con E. carotovora no revelan practicamente la presencia de ningún tipo de azúcar, como podemos comprobar en la fig. 20, en la que solo puede apreciarse un leve residuo de glucosa y xilosa con el rastro que deja la muestra en su recorrido.

Se trata, por lo tanto, de una diferencia que jugamos interesante en

.../

Fig. 19. - Cromatograma de azúcares libres en tejido sano de Phaseolus vulgaris L. crecida con 6 = 0; 7 = 4×10^{-3} y 8 = 15×10^{-3} M de NO_3K .

Fig. 20. - Cromatograma de azúcares libres en tejido de Phaseolus vulgaris L. inoculado con Erwinia carotovora y desarrollado en medios con 1 = 0; 2 = 4×10^{-3} y 3 = 15×10^{-3} M de NO_3K (del 4 al 9 testigos de lactosa, sacarosa, glucosa, levulosa y xilosa).



la evolución del proceso infectivo que experimenta el vegetal cuando es invadido, como en este caso, por una bacteria fitopatógena.

2. Sustancias reductoras.

Se ha demostrado que las sustancias reductoras ejercen un importante papel en diversos aspectos de la fisiología de la planta. La influencia del potasio sobre su contenido en los tejidos de Ph. vulgaris L. ha resultado ser también significativa como podemos ver en la fig. 21.

Hasta un $4 \times 10^{-3}M$ de NO_3K en el medio, apenas si modifica el contenido de sustancias reductoras acumuladas en el tejido vegetal, pero sobrepasando esta dosis se manifiesta un incremento notable que alcanza su valor máximo cuando el NO_3K llega a $8 \times 10^{-3}M$ y este valor se mantiene para mayores concentraciones de la sal potásica.

En las mismas plantas, una vez infectadas por E. carotovora, se observa igualmente bastante estabilidad en el contenido de sustancias reductoras para niveles de NO_3K por debajo de $10^{-3}M$. (Fig. 22). Cuando aumenta el NO_3K disponible por el vegetal, hemos comprobado un descenso muy marcado en las sustancias reductoras que se hace siete veces menor para una concentración de NO_3K de $15 \times 10^{-3}M$.

.../

—●— *Subs reductoras*
 —○— " *pécticas*

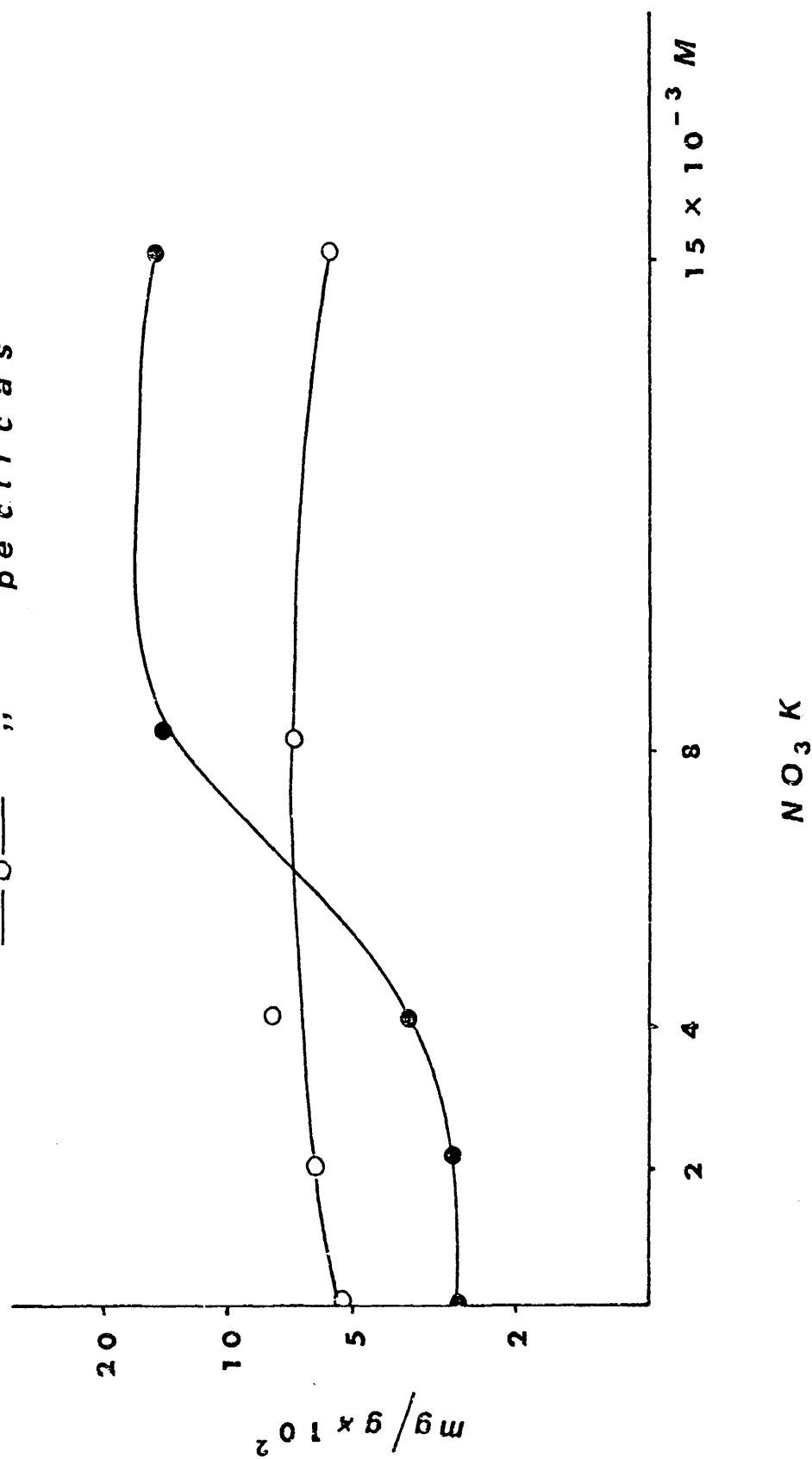


Fig.2L.- Contenido en sustancias reductoras y sustancias pécticas en plantas de Phaseolus vulgaris L. desarrolladas en un medio con distintas concentraciones de $\text{NO}_3 \text{ K}$.

3. Sustancias pécticas.

Las sustancias pécticas en la planta desempeñan una importante función estructural y metabólica.

Su contenido en el tejido sano de Phaseolus vulgaris L. puede decirse que apenas se altera con relación al NO_3K existente en el medio, como se refleja en la Fig. 21, donde los valores correspondientes a las plantas que crecen disponiendo de NO_3K en cantidades diferentes, no ofrecen diferencias notables que permitan establecer alguna relación concreta entre ambos factores.

Cuando en las mismas condiciones que estamos considerando, procedemos a infectar todas las plantas con E. carotovora y analizamos, en el tejido enfermo, las sustancias pécticas existentes, nos encontramos con los valores que aparecen en la Fig. 22, por lo que se puede aceptar que a partir de 8×10^{-3} M de NO_3K en el medio, el tejido enfermo experimenta un aumento en sustancias pécticas que se intensifica a medida que se eleva la concentración de la sal potásica.

4. Aminoácidos libres.

Se ha llevado a cabo un estudio muy completo de estos componentes nitrogenados de la planta, por el importante papel que desempeñan en su metabolismo y, muy especialmente, en la síntesis de proteínas y enzimas vegetales.

.../

Los análisis cromatográficos en papel y en capa fina dan resultados analogos y nos conducen a un conocimiento cualitativo de los aminoácidos que existen en el tejido de judia.

Las Figs. 23 y 24 recogen los resultados obtenidos con muestras de judia sana y enferma respectivamente, que han crecido disponiendo de concentraciones crecientes de NO_3K , correspondientes, del nº 1 al 5 respectivamente, a $0,2 \times 10^{-3}\text{M}$, $4 \times 10^{-3}\text{M}$, $8 \times 10^{-3}\text{M}$ y $15 \times 10^{-3}\text{M}$.

Las conclusiones que puedan deducirse poseen todas las limitaciones inherentes al método, por lo que solo es razonable señalar la presencia de once aminoácidos que se repiten en todas las muestras, aunque en distinta proporción. La identificación de cada sustancia se hace tanto por determinación de su R_f como por comparación con una serie de patrones conocidos que se hacen correr en el mismo cromatograma. Así, aparece en la Fig. 25, la muestra de judia sana en el nº 0 y de judia enferma en el nº 13, crecidas ambas plantas en presencia de $8 \times 10^{-3}\text{M}$ de NO_3K , y entre ellas convenientemente colocada una serie de aminoácidos para facilitar la identificación de cada muestra. El más ligero examen permite indicar un incremento de aminoácidos en el tejido enfermo, si bien

.../

Fig. 23. - Aminoácidos libres en tejido sano de Phaseolus vulgaris L. que se desarrolla disponiendo de cantidades crecientes de NO_3K .

Fig. 24. - Aminoácidos libres en tejido enfermo de Phaseolus vulgaris L. después de infectado con Erwinia carotovora, que se desarrolla en cantidades crecientes de NO_3K .

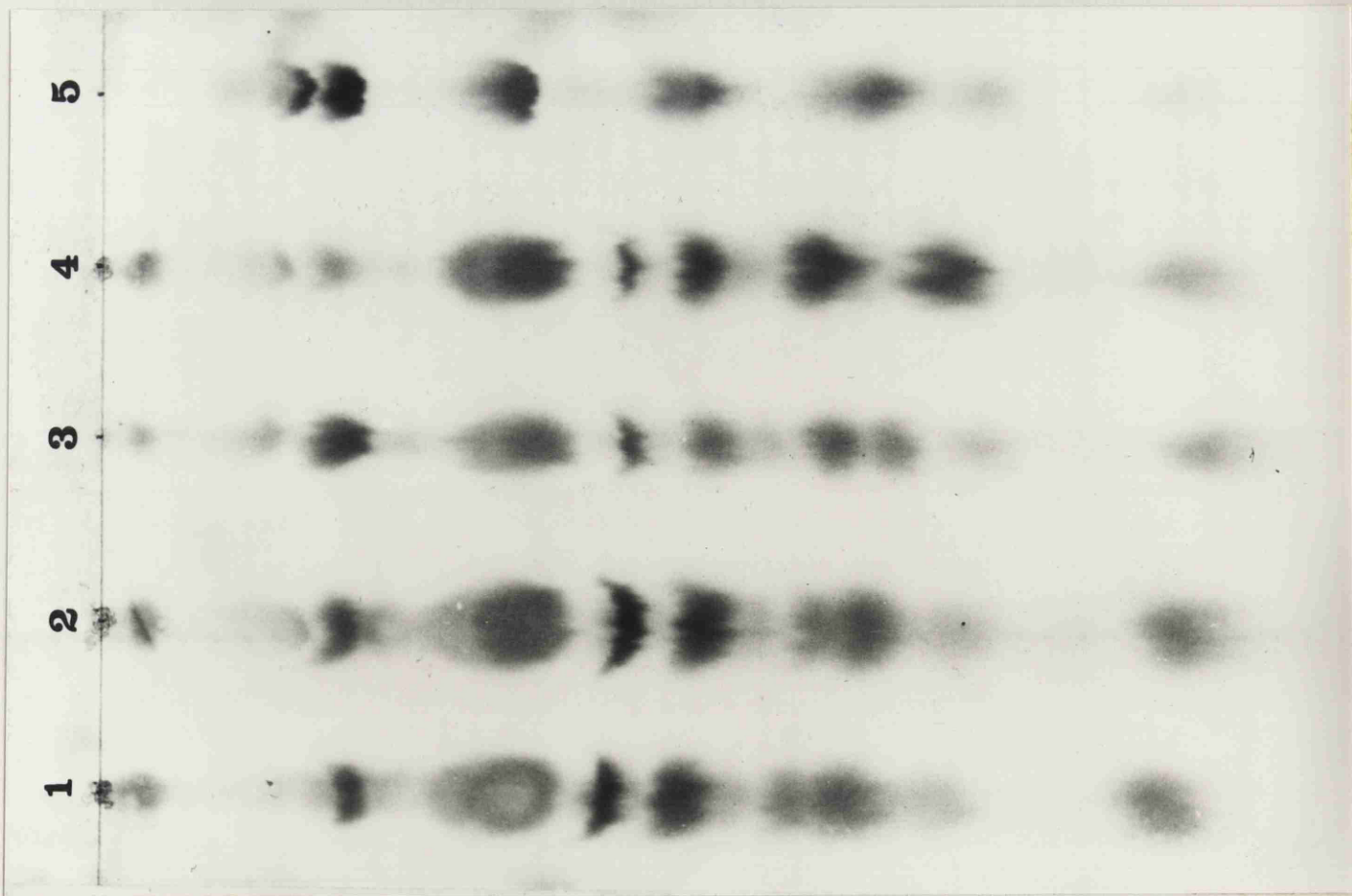
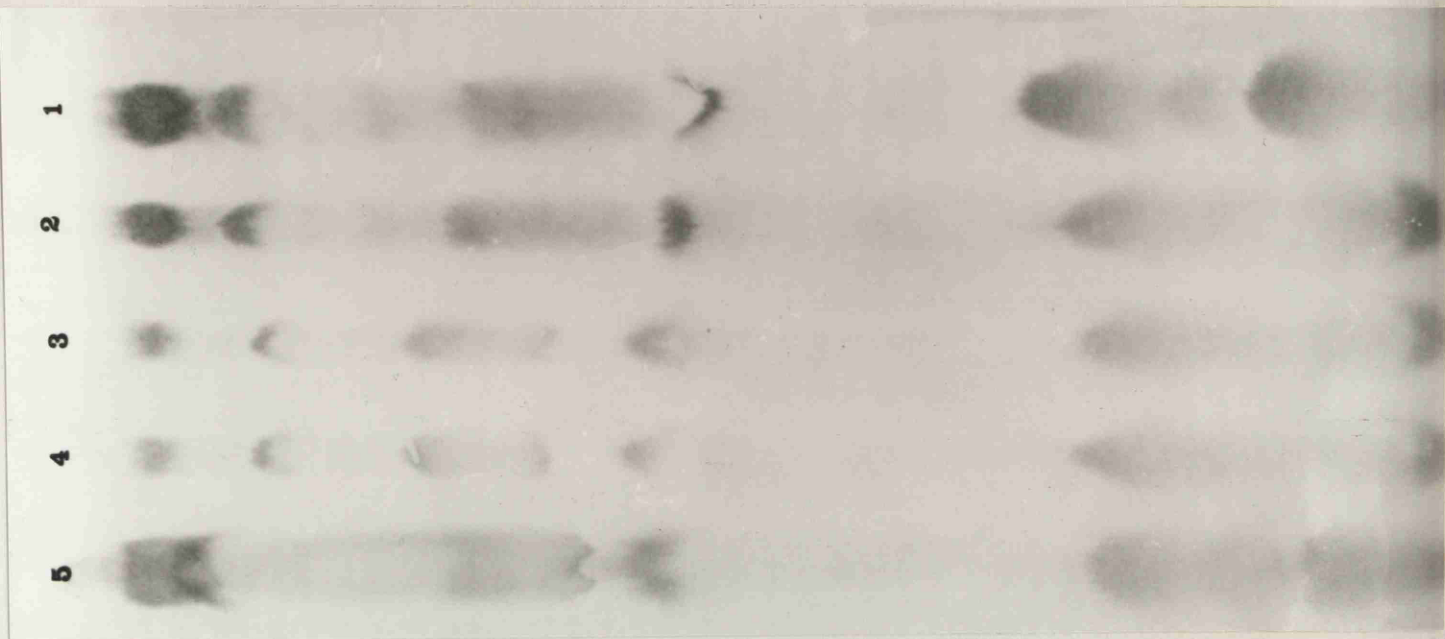




Fig. 25.- Aminoácidos libres en planta sana (0) y enferma (13) de Phaseolus vulgaris L. desarrolladas en presencia de NO_3K 8×10^{-3} M.

la expresión de estos resultados exigen el empleo de técnicas más precisas, por lo que se ha recurrido al analizador de aminoácidos, al que se le proporcionan tres muestras de judía sana y otras tres de judía infectada con E. carotovora, que corresponden a las plantas desarrolladas en presencia de $0,4 \times 10^{-3}M$ y $15 \times 10^{-3}M$ de NO_3K en el medio. Los datos obtenidos por este procedimiento aparecen en las Figs. 26 - 31 que se han obtenido utilizando concentraciones adecuadas de cada extracto, con el fin de que la cantidad de material aportado proporcione dosis de aminoácidos que no sobrepasen las posibilidades del sistema de inscripción gráfica de que está dotado el aparato.

Por esta causa, y con el fin de facilitar la comparación entre todas las muestras, hemos efectuado en la TABLA I los cálculos oportunos, a fin de referir las cantidades halladas de cada aminoácido a un peso único de tejido vegetal, peso que ha sido fijado en 50 mg.

.../

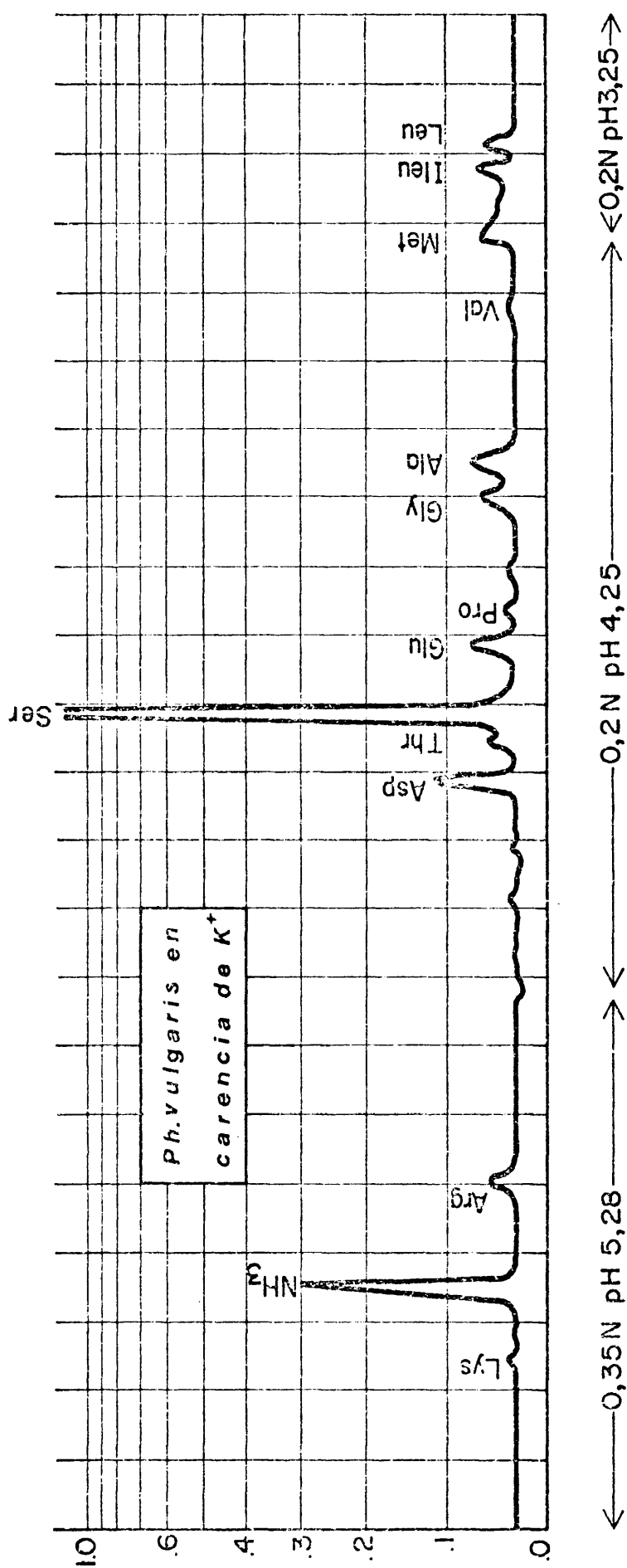
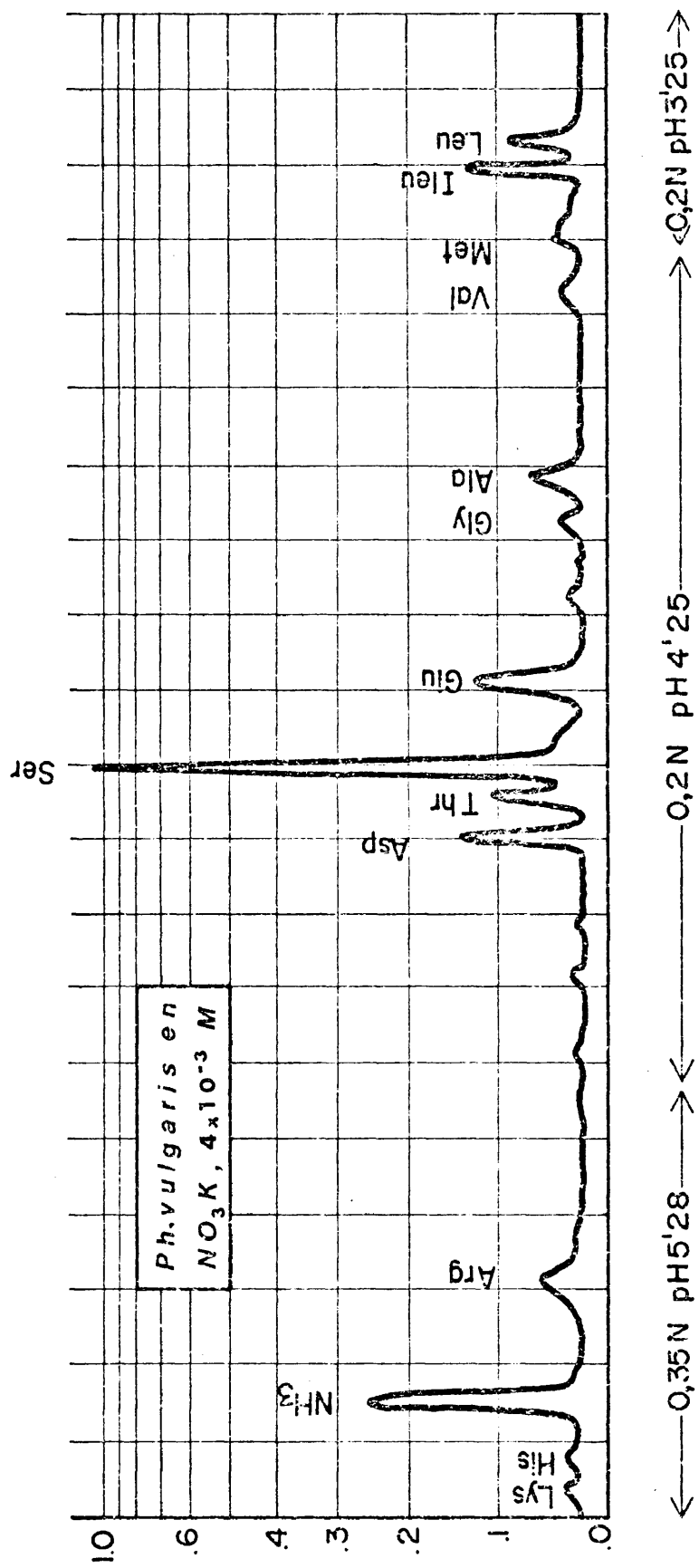


Fig. 26-Análisis cromatográfico de aminoácidos en Ph. vulgaris L., sobre medio carente de NO_3K .



27.- Análisis cromatográfico de aminoácidos en Ph. vulgaris L. sobre NO_3K $4 \times 10^{-3} \text{ M}$.

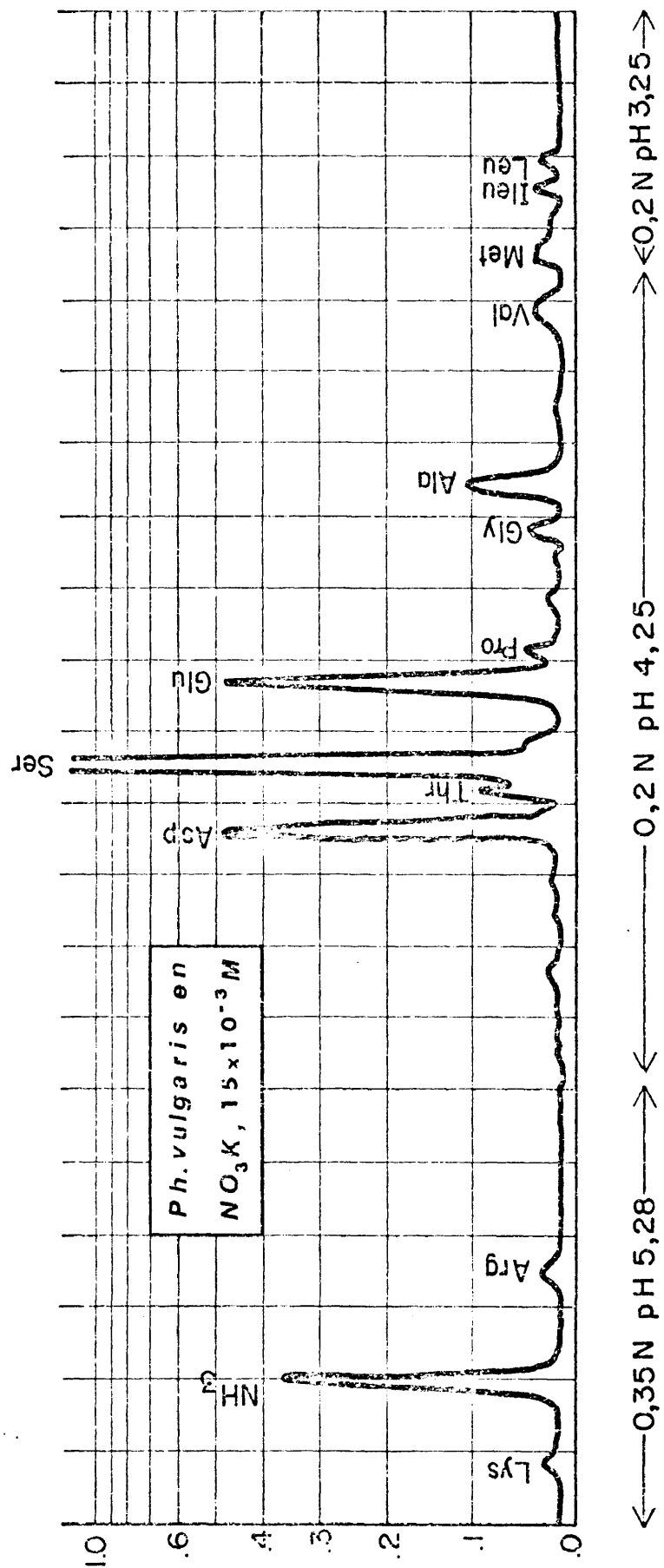


Fig. 28. - Análisis cromatográfico de aminoácidos en *Ph. vulgaris* L. sobre NO_3K , $15 \times 10^{-3} \text{ M}$.

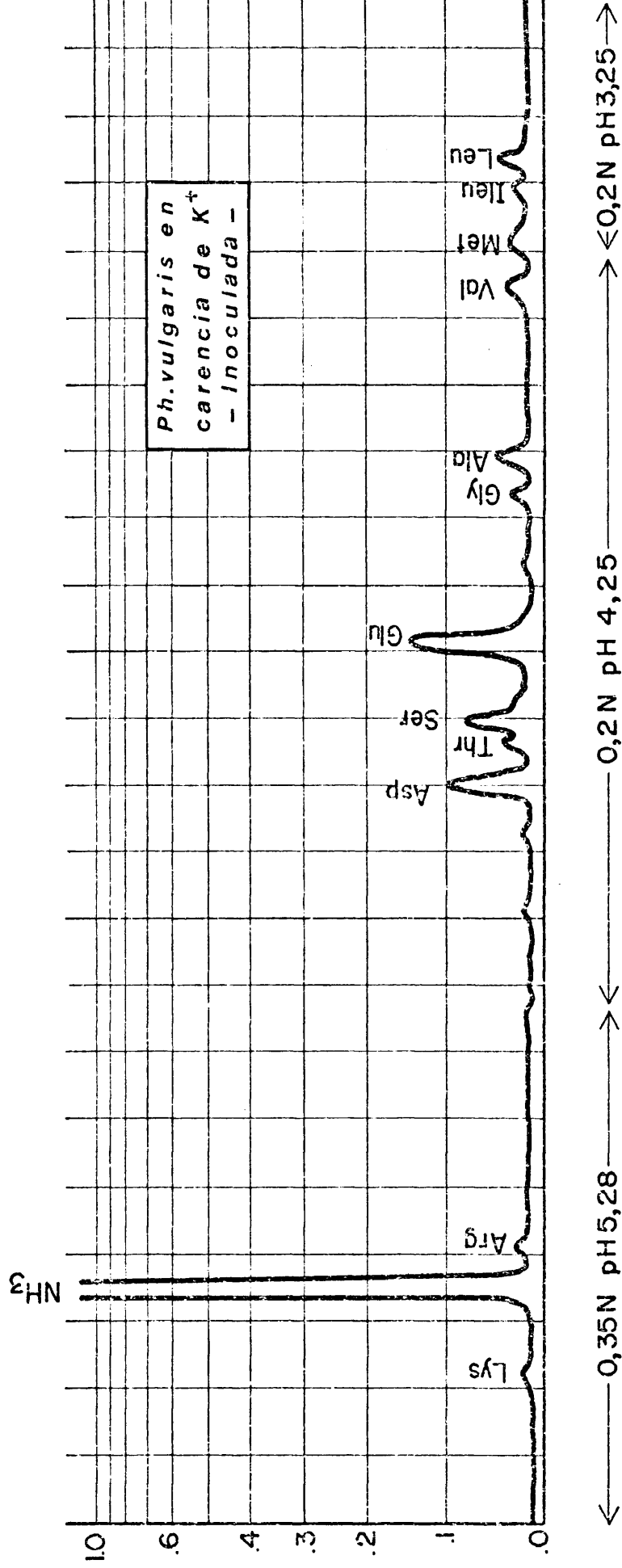
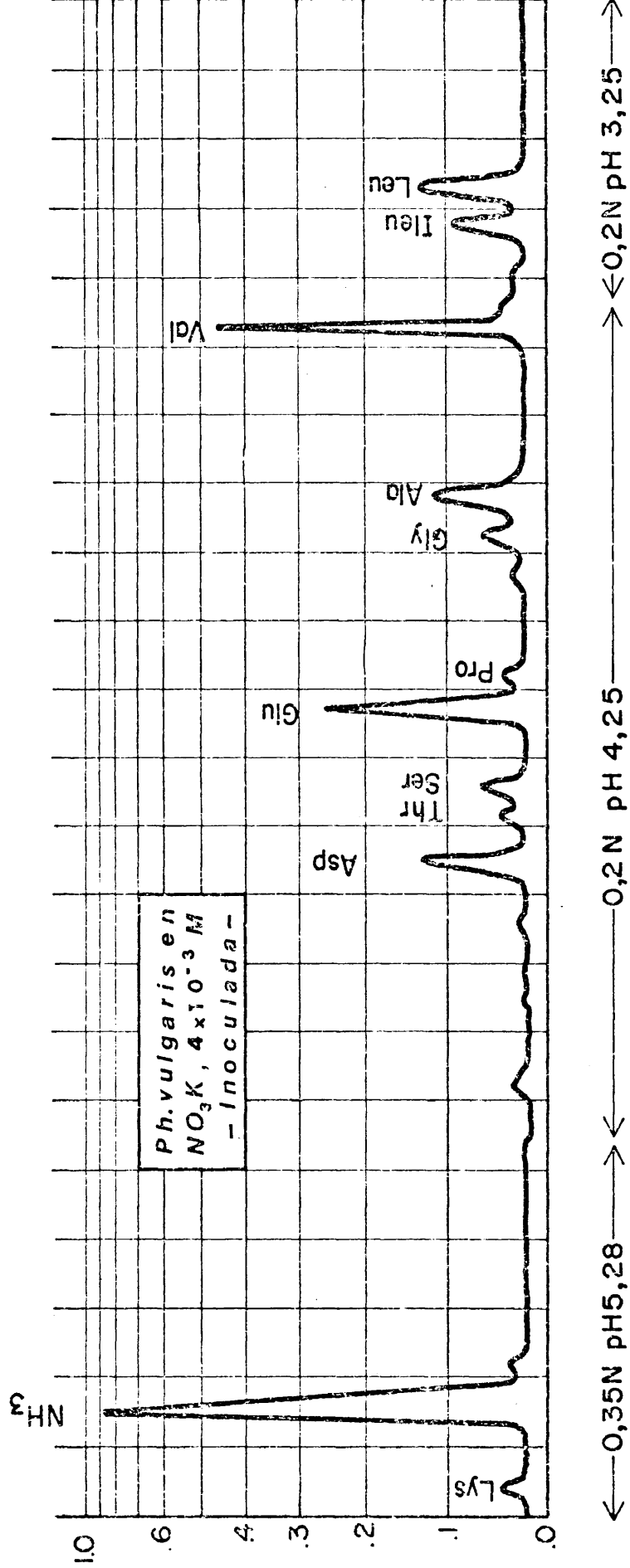


Fig. 29.-Análisis cromatográfico de aminoácidos en Ph. vulgaris L₄, sobre medio carente de NO_3K , e inoculada con E. carotovora.



g. 30.- Análisis cromatográfico de aminoácidos en *Ph. vulgaris* L. sobre NO₃K, 4 x 10⁻³M, e inoculada con *E. carotovora*.

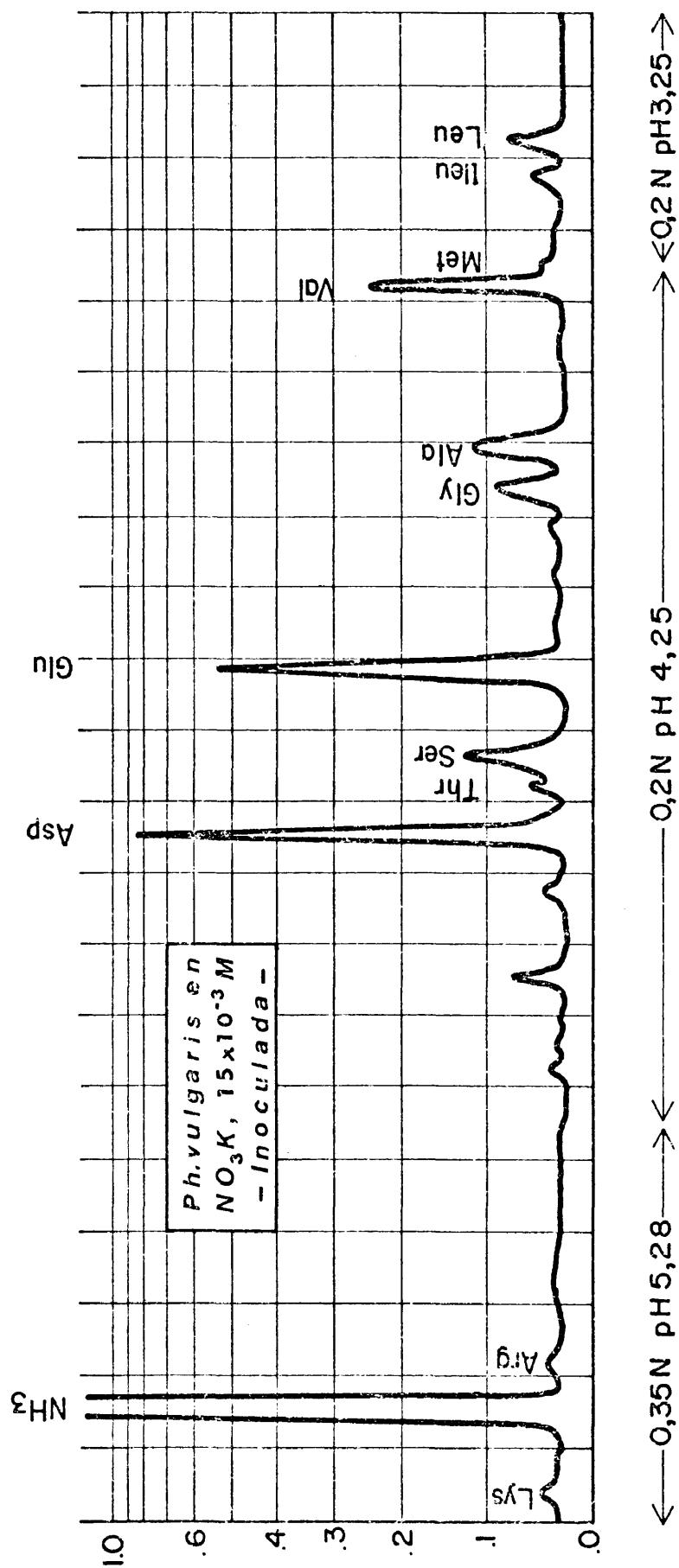


Fig. 31 .- Análisis cromatográfico de aminoácidos en *Ph. vulgaris* L. sobre NO₃K, 15 x 10⁻³M. e inoculada con *E. carotovora*.

Tabla nº 1

Aminoácidos existentes en 50 mg. de tejido fresco de Phaseolus vulgaris sano (S) y enfermo (E), cuando se desarrolla en un medio con diferentes concentraciones de NO₃K.

Conc. de NO ₃ K (M)	0		4 x 10 ⁻³		15 x 10 ⁻³	
Estado del tejido	S	E	S	E	S	E
Lisina	0.00473	-	0.0038	0.0087	0.0063	0.0076
Histidina	-	-		-	-	-
NH ₃	0.2149	0.8313	0.1804	2.7756	0.2308	0.9389
Arginina	0.04138	-	0.0581	-	0.0115	0.0049
Ac. aspártico	0.04071	0.0302	0.0375	0.0338	0.1119	0.1590
Treonina	0.01266	0.0064	0.0272	0.0087	0.0328	0.0149
Serina	0.5864	0.0311	0.3277	0.0127	0.264	0.0487
Ac. glutámico	0.03005	0.0564	0.0424	0.0865	0.1399	0.1498
Prolina	-	-	-	0.0103	0.0329	-
Glicina	0.0208	0.0062	0.0084	0.0191	0.0121	0.0261
Alanina	0.03001	0.0205	0.0234	0.0497	0.0445	0.0409
Valina	0.00354	0.0141	0.0118	0.0706	0.0157	0.0524
Isoleucina	0.01333	0.0064	0.0345	0.0270	0.0078	0.0122
Leucina	0.00986	0.0103	0.0220	0.0437	0.0074	0.0190
Tirosina	-	-	-	-	-	-
Fenilalanina	-	-	0.0034	-	0.0021	-

5. Nitrógeno total.

El contenido en nitrógeno de las plantas sanas presenta el valor más elevado en los estados de carencia y de concentración mínima de potasio en el medio, pero conforme esta concentración empieza a subir, aquel desciende paulatinamente (Fig. 32). Todo lo contrario ocurre cuando el mismo análisis se efectúa en plantas previamente infectadas con E. carotovora. En ellas el nivel de nitrógeno es muy pequeño, respecto a las plantas sanas, en los primeros estadios de la experiencia, pero rápidamente comienza un ascenso equilibrado a medida que el potasio presente en el medio aumenta (Fig. 33).

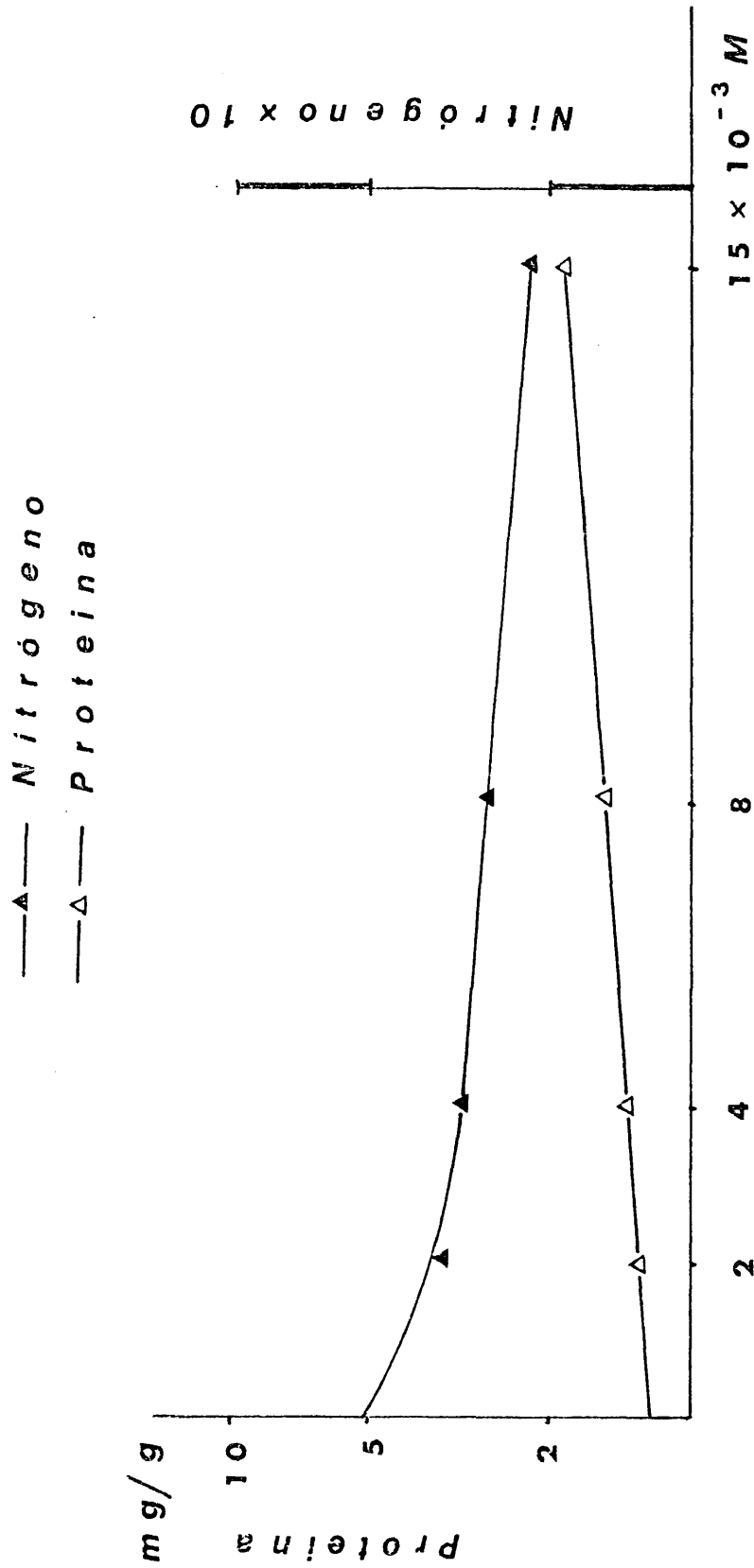
Por lo tanto, también aquí podemos señalar una cierta relación entre el potasio del medio y el metabolismo nitrogenado del vegetal.

6. Proteínas.

Las proteínas vegetales se han señalado siempre como uno de los factores decisivos en la defensa que las plantas puede desarrollar cuando se ven atacadas por cualquier microorganismo patógeno.

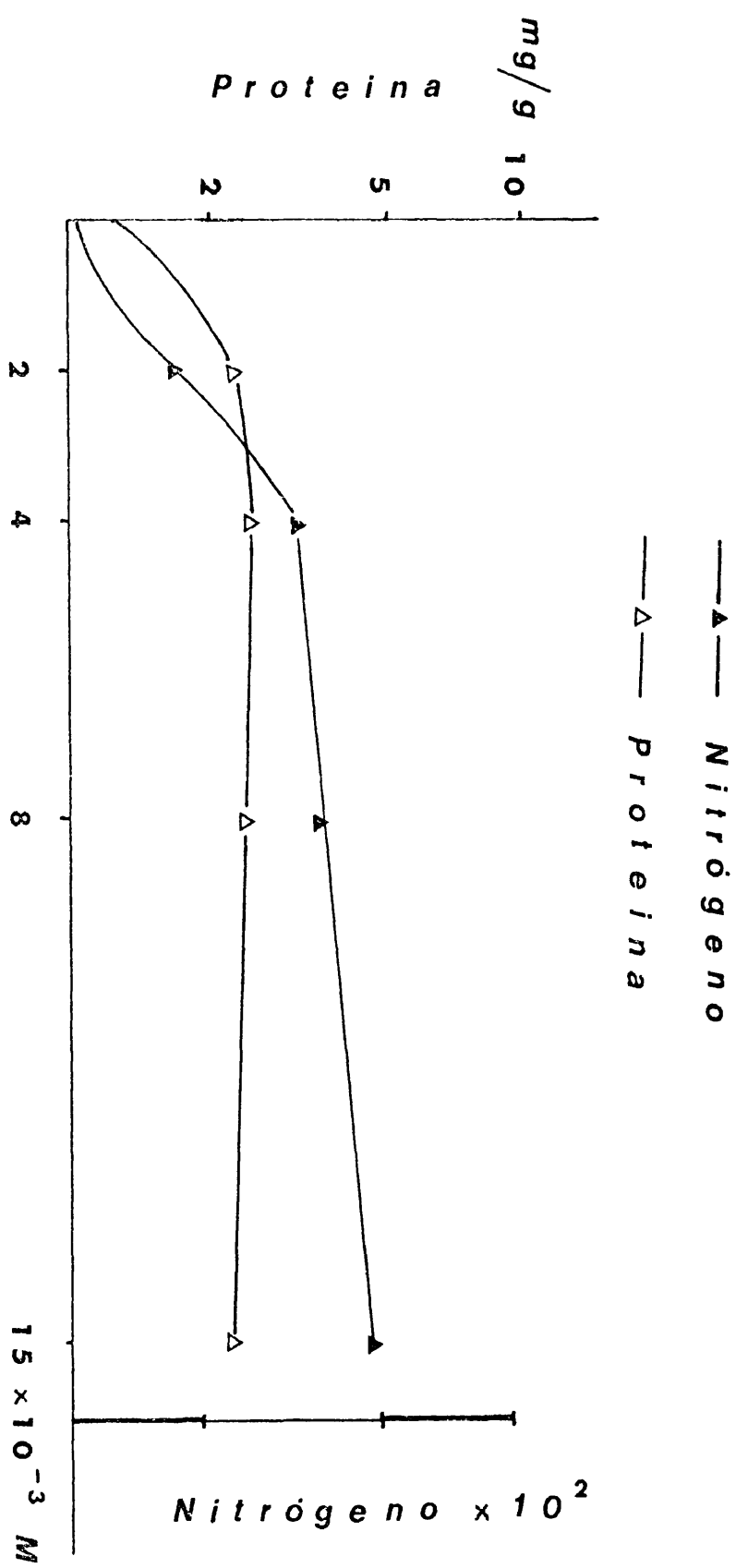
Por ello, hemos realizado los análisis correspondientes y los resultados obtenidos se han representado en las Fig. 32 y 33, que muestran el contenido proteico de las plantas de judía antes y después de ser inoculadas con E. carotovora.

.../



NO_3K

Fig. 32.- Análisis de nitrógeno y proteína en los tejidos de Phaseolus vulgaris L., procedentes de plantas desarrolladas en presencia de distintas concentraciones de NO_3K .



e. Síntesis de enzimas pectolíticas.

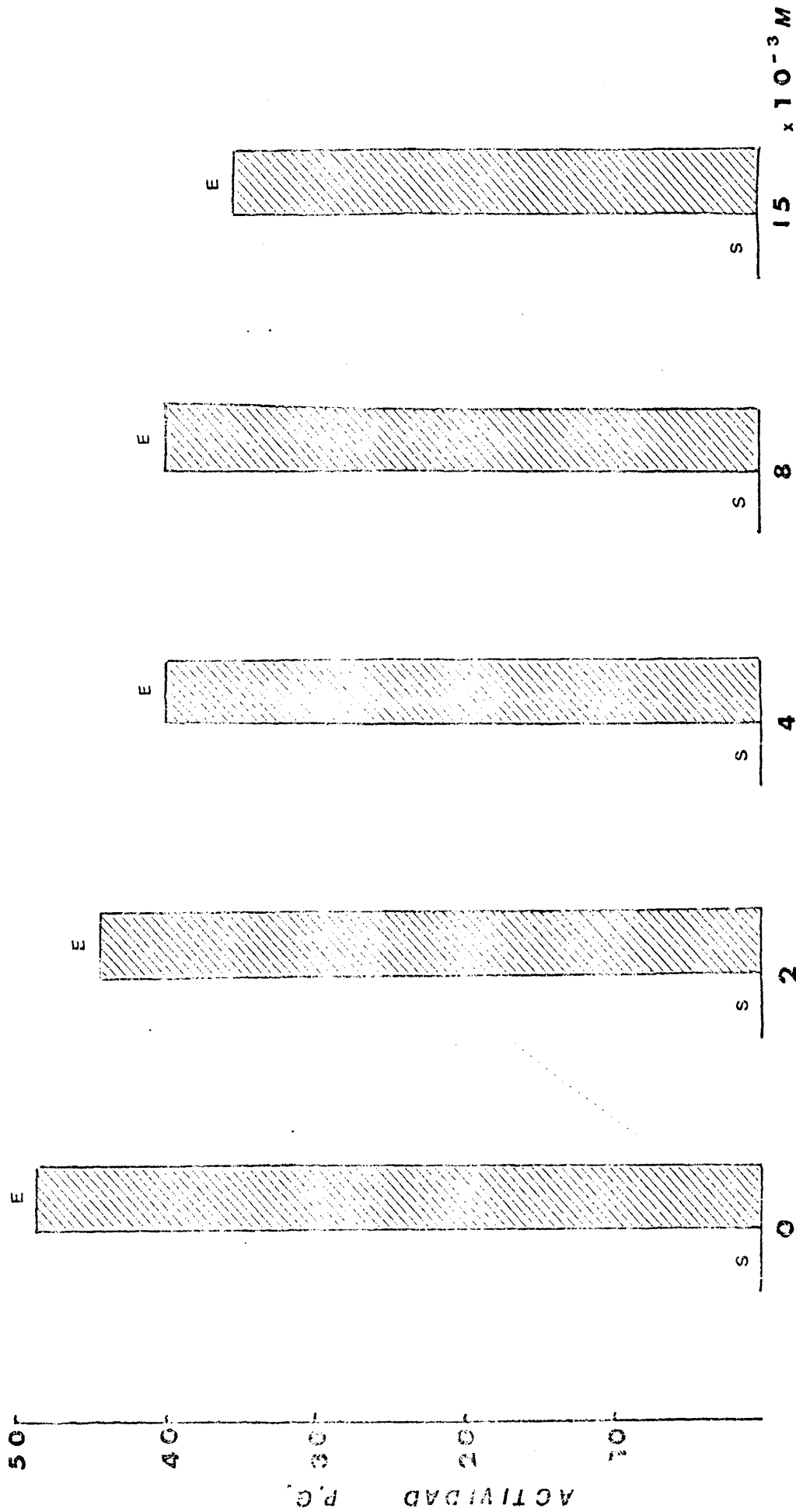
Nuestro estudio se ha dirigido hacia la determinación de las enzimas pécticas, responsables de podredumbres que pueden existir en los tejidos de la planta, concretamente de poligalacturonasa (PG), pectatotranseliminasa (PATE) y pectintranseliminasa (PTE).

1. En lo que se refiere a PG, se ha encontrado una ausencia total de esta enzima en todas las plantas sanas, mientras que en las enfermas, adquiere altos valores que luego disminuyen según aumenta la concentración de potasio en el medio, como podemos ver en la Fig. 34.

2. En el caso de PATE, sin embargo, no parece que el potasio influya directamente, ya que según muestra la figura 35, tanto en las plantas sanas como en las enfermas, se mantiene un nivel enzimático prácticamente constante a lo largo de las diferentes concentraciones de potasio. Solo en las plantas inoculadas, se observa un pequeño aumento de dicho nivel respecto al que se presenta en las no inoculadas.

3. Es digno de destacar, según se puede apreciar en la Fig. 36, el notable aumento en el contenido de PTE que manifiestan las plantas inoculadas con E. carotovora en relación con las plantas no infectadas.

La mayor o menor cantidad de NO_3K presente en el medio de desarrollo no parece tener intervención en la síntesis enzimática del tejido vegetal, según los resultados obtenidos.



Concentración de NO_3K

Fig. 34.- Presencia de PG en plantas sanas (s) y enfermas (e) de Ph. vulgaris L., desarrolladas en medios con distintas cantidades de NO_3K .

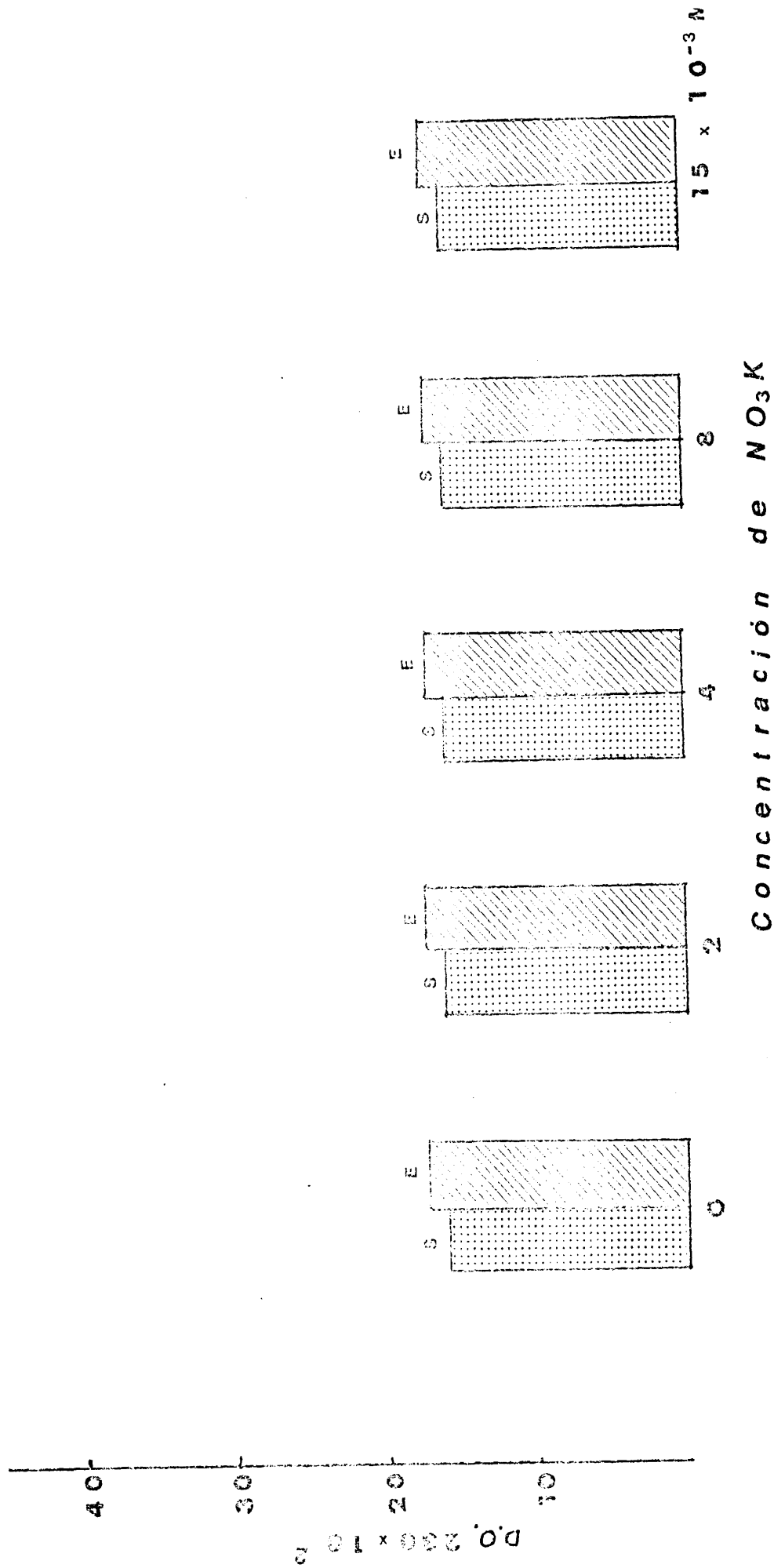


Fig. 35.- Presencia de PATE en plantas sanas (s) y enfermas (e) de Ph. vulgaris L. desarrolladas en medios con distintas concentraciones de NO_3K .

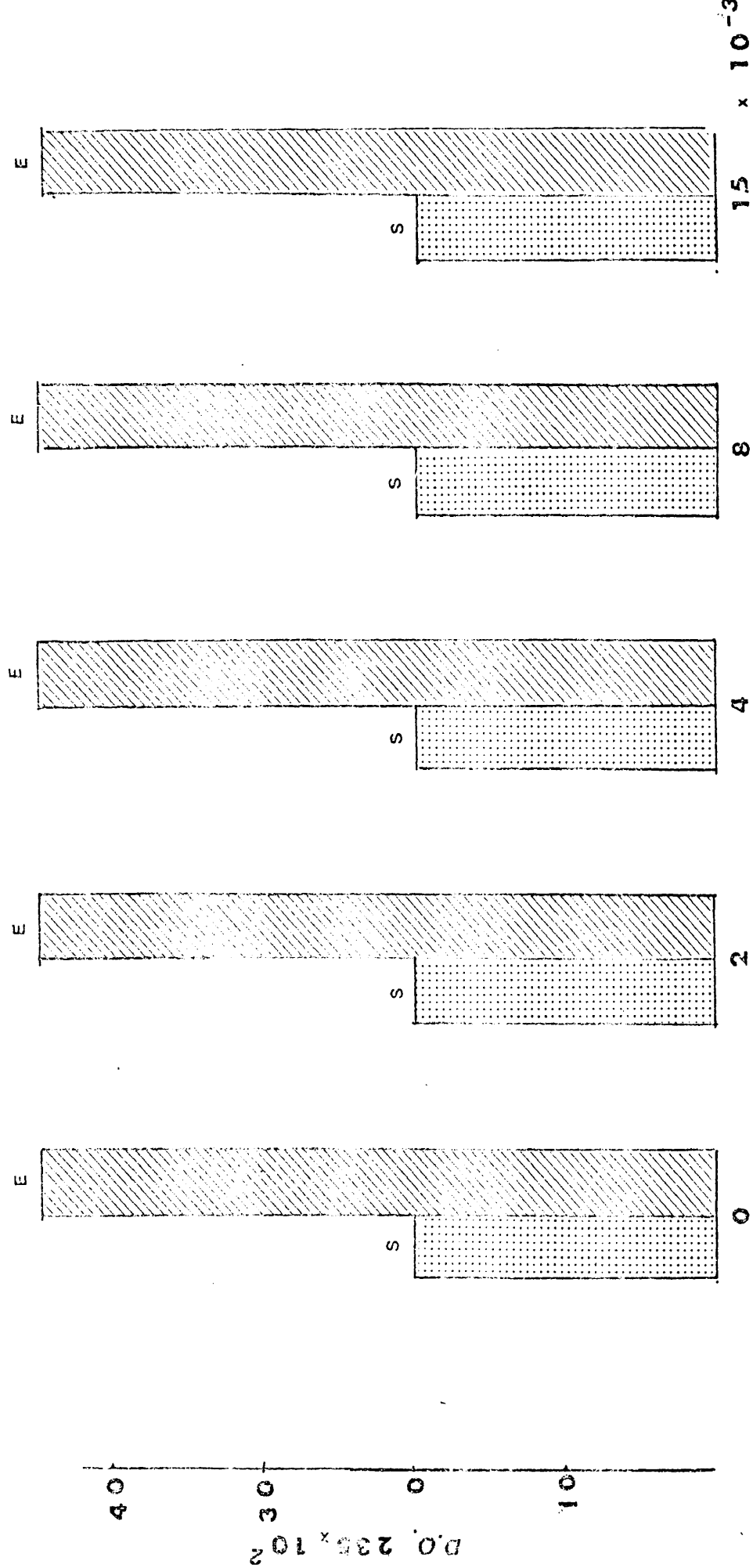


Fig. 36.- Presencia de PTE en plantas sanas (s) y enfermas (e) de *Ph. vulgaris* L. desarrolladas en medios con distintas cantidades de NO_3K .

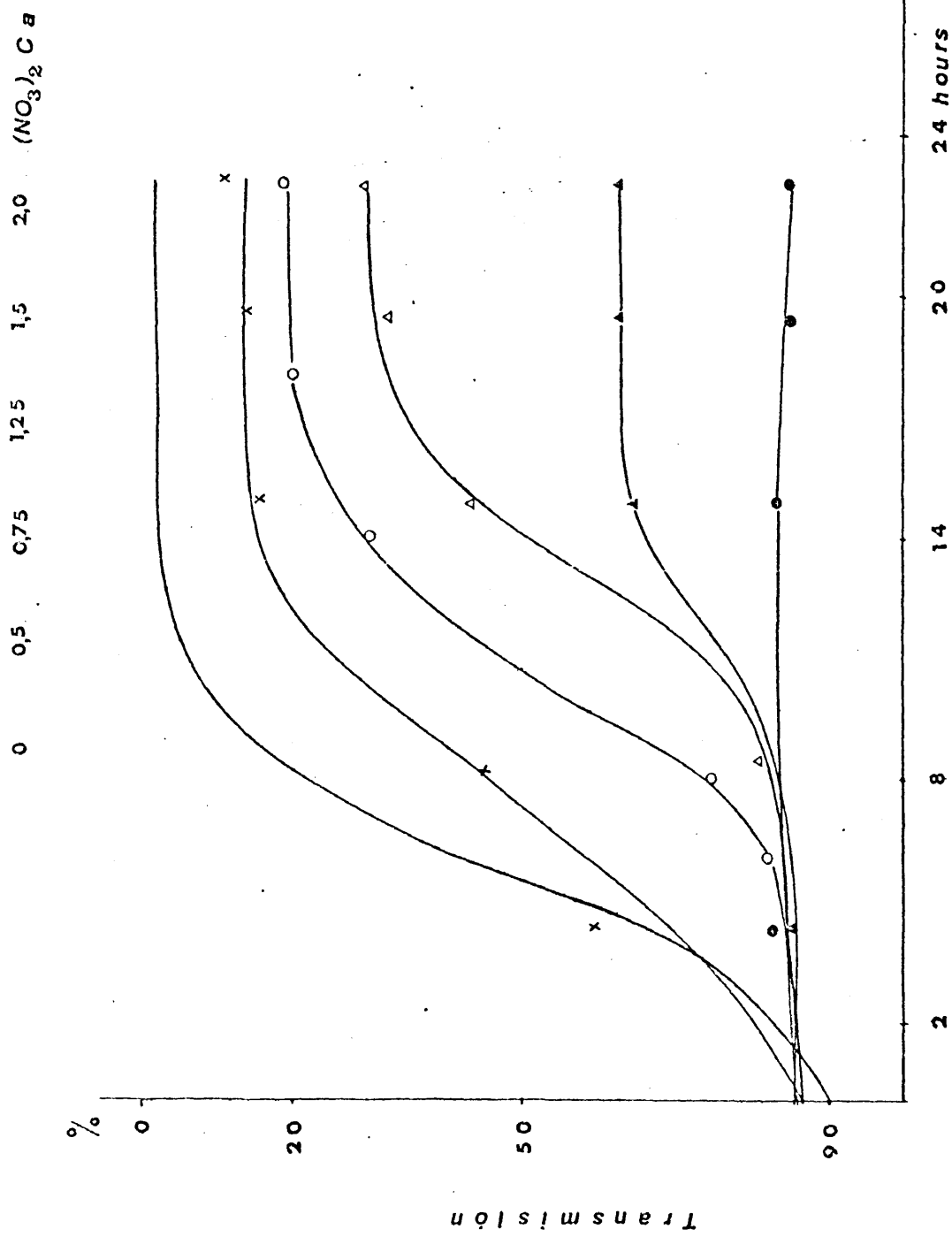
D. - INFLUENCIA DEL IÓN Ca^{++} SOBRE EL
MICROORGANISMO PATOGENO.
ERWINIA CAROTOVORA.

a. Crecimiento.

Recordando cuanto hemos indicado en el apartado de Material y Métodos, hemos de insistir acerca de las limitaciones que presenta la incorporación de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ al medio base en el que intentamos observar el comportamiento de E. carotovora. La naturaleza del ión Ca^{++} provoca una serie de precipitaciones con los componentes del medio, tanto por la formación de sales insolubles con las sustancias inorgánicas, como por la formación de puentes de unión entre moléculas pépticas. Ello crea como consecuencia no solo dificultades en el crecimiento bacteriano, sino también a nivel de medidas fotométricas en el Spectronic. Por lo tanto, nos hemos visto obligados a prescindir de concentraciones elevadas de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ y utilizar como máxima la de 2%, por ser la que presenta muy suavizados los inconvenientes que acabamos de indicar.

Los resultados que corresponden a la intervención del $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ en el crecimiento celular de E. carotovora, aparecen en la Fig. 37 y revelan la gran sensibilidad que la bacteria acusa ante su presencia.

.../



Tiempo de cultivo

Fig. 37.- Efecto de la presencia de $(\text{NO}_3)_2 \text{Ca}$ en el crecimiento de Erwinia carotovora.

b. Síntesis. de enzimas pectolíticas.

Son las tres enzimas, a las que hemos aludido en el caso del potasio, las que vamos a considerar en cuanto a la intervención que el $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ puede tener sobre su síntesis por E. carotovora.

1. La Fig. 38 muestra que 0,25% de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ en el medio es ya capaz de reducir en un 15% la enzima PG, y este efecto inhibitor alcanza el 85% cuando la concentración de la sal cálcica llega al 1%.
- 2.3. En el caso de la enzima PATE, basta un 0,5% de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ en el medio de cultivo para que la inhibición de la enzima alcance el 70%, como se observa en la Fig. 39, que muestra, por otra parte, resultados bastante concordantes con los de la Fig. 40 correspondientes a la inhibición ejercida sobre PTE, inhibición que alcanza el 58% para la misma concentración de 0,5% de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$.

.../

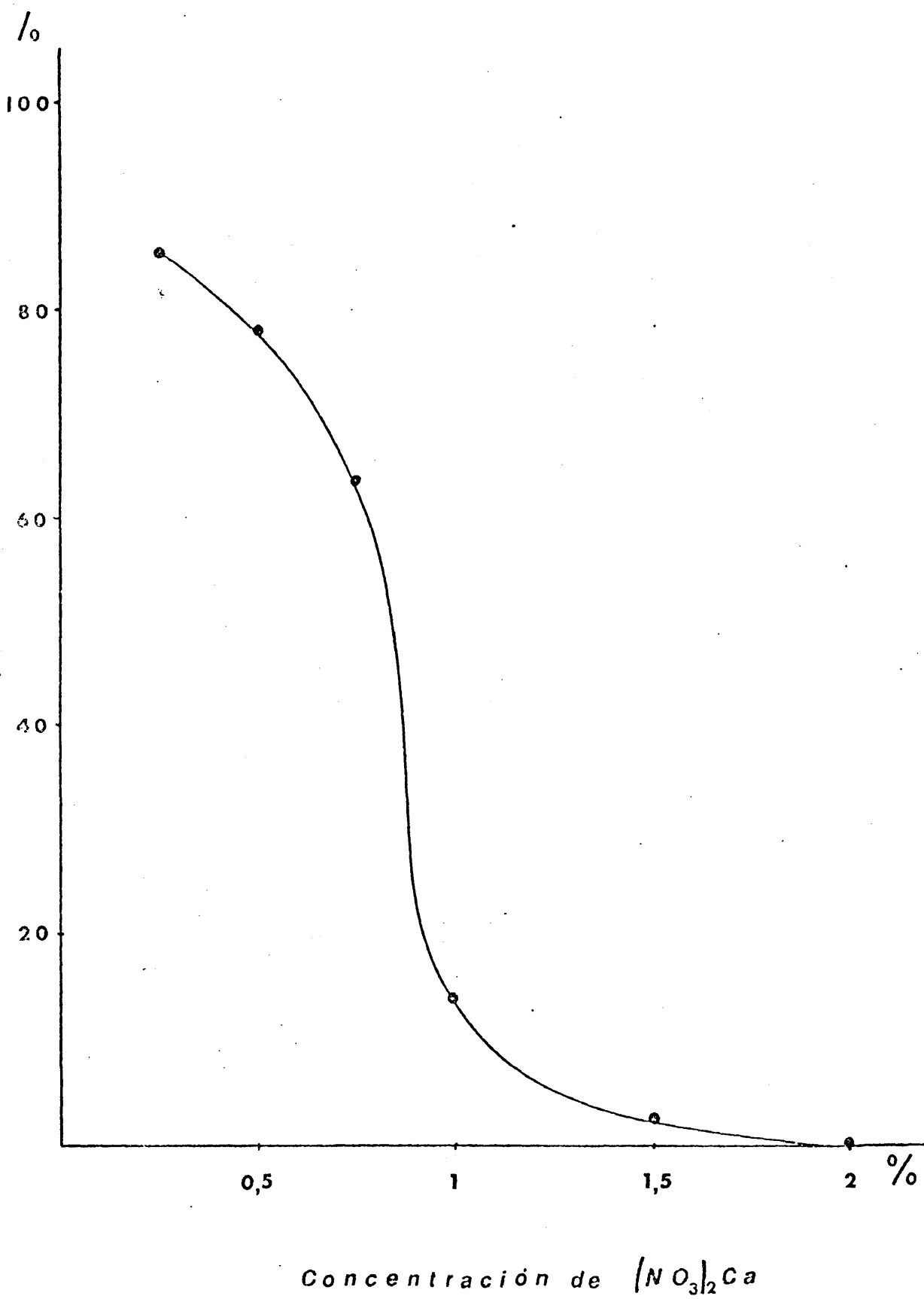


Fig. 38.- Acción del $(NO_3)_2Ca$ sobre la síntesis de PG por *E. carotovora*.

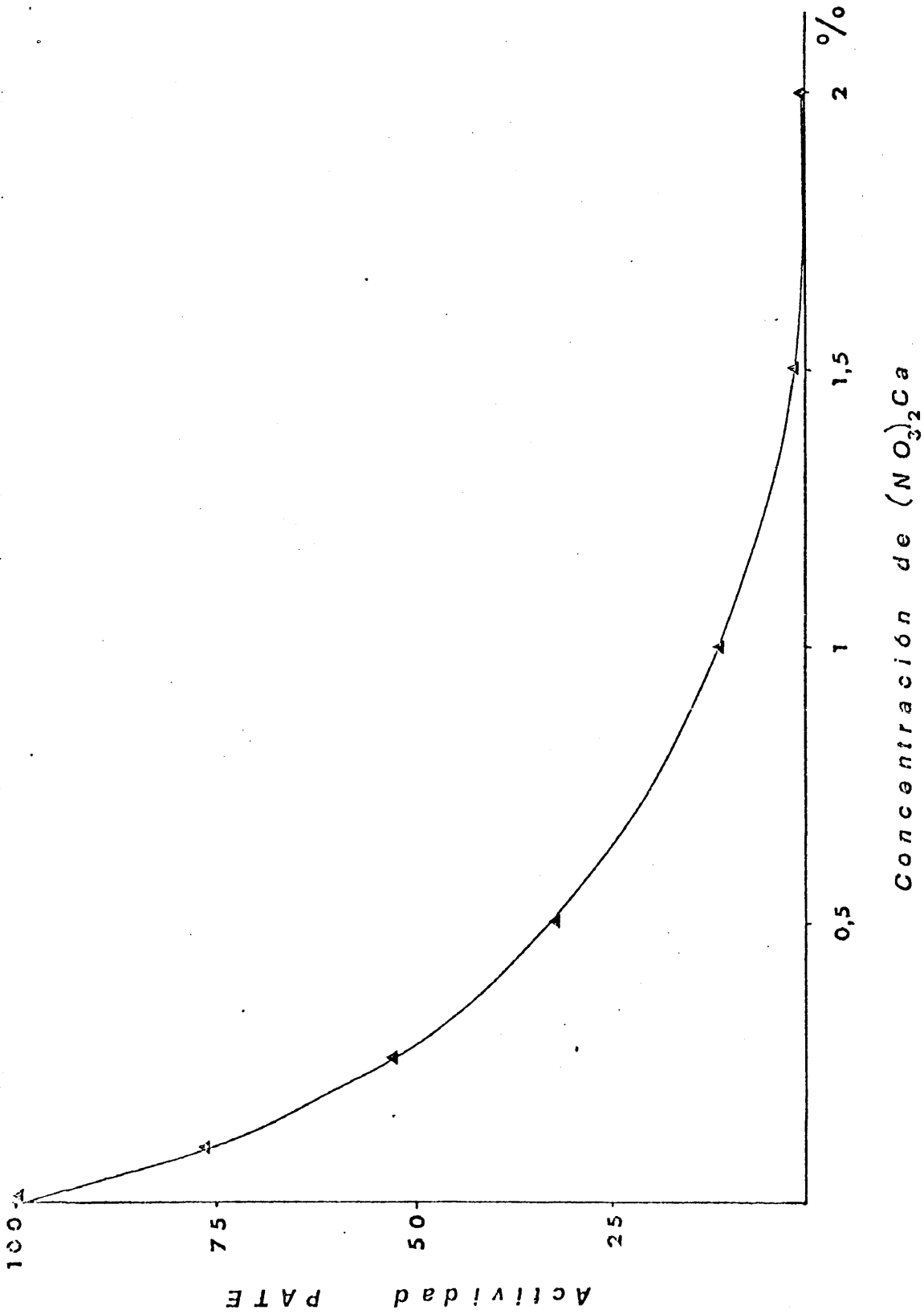


Fig. 39.- Acción del $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ sobre la síntesis de PATE por E. carotovora.

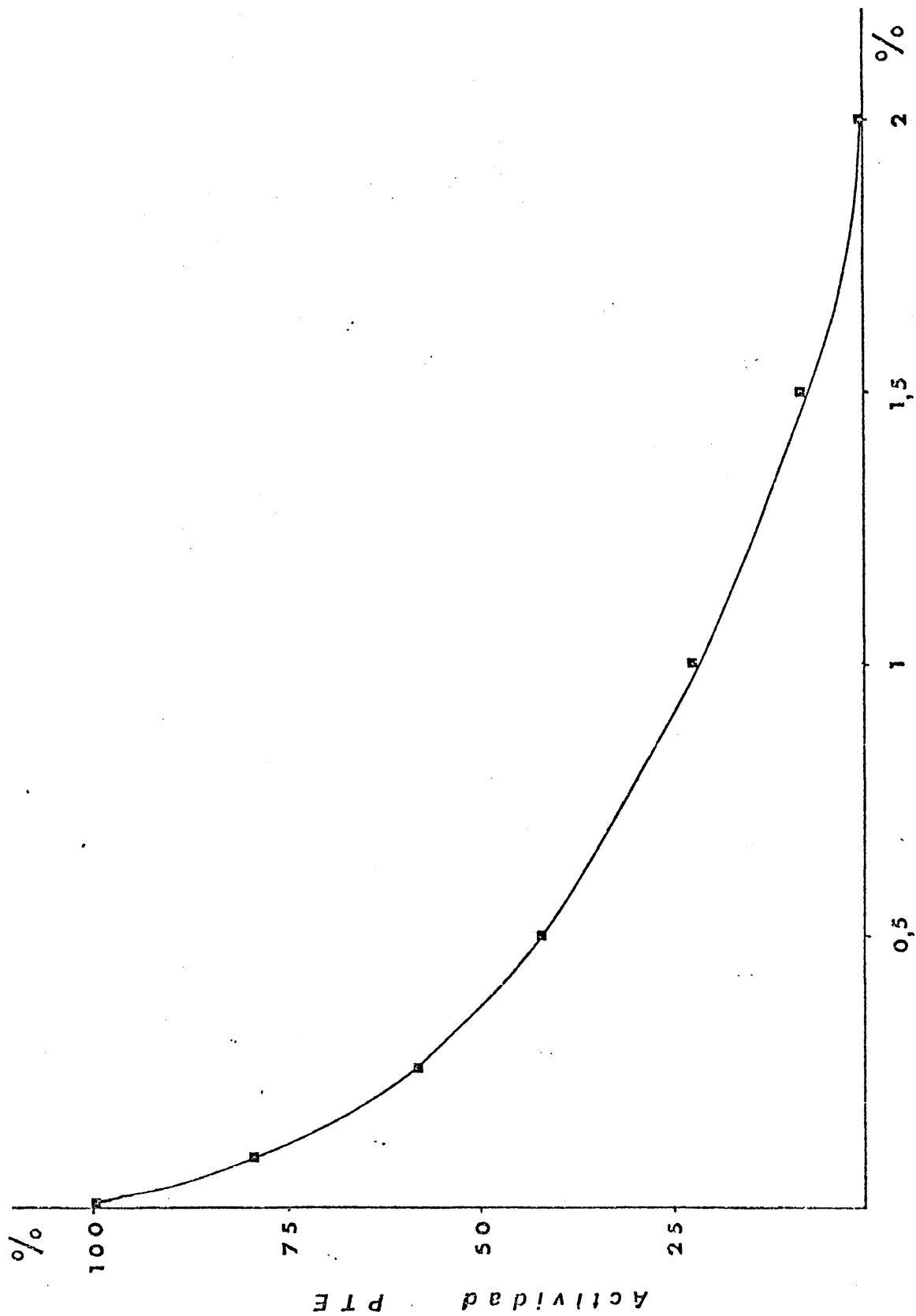


Fig. 40. - Acción del $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ sobre la síntesis de PTE por E. carotovora.

E. INFLUENCIA DEL ION Ca^{++} SOBRE LA PLANTA HUESPED. PHASEOLUS VULGARIS L.

a. Crecimiento.

No hay duda de que el calcio es uno de los elementos cuya presencia en el medio se acusa de forma muy ostensible sobre el crecimiento de Ph. vulgaris L., como puede comprobarse por la Fig. 41. Una concentración alta de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ interviene de forma negativa en el desarrollo de la planta, incluso en mayor grado que lo hacen dosis a nivel carencial. Por los resultados que presentamos, es la concentración de $4 \times 10^{-3}\text{M}$ de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ la más eficaz y beneficiosa para el crecimiento de Ph. vulgaris L.

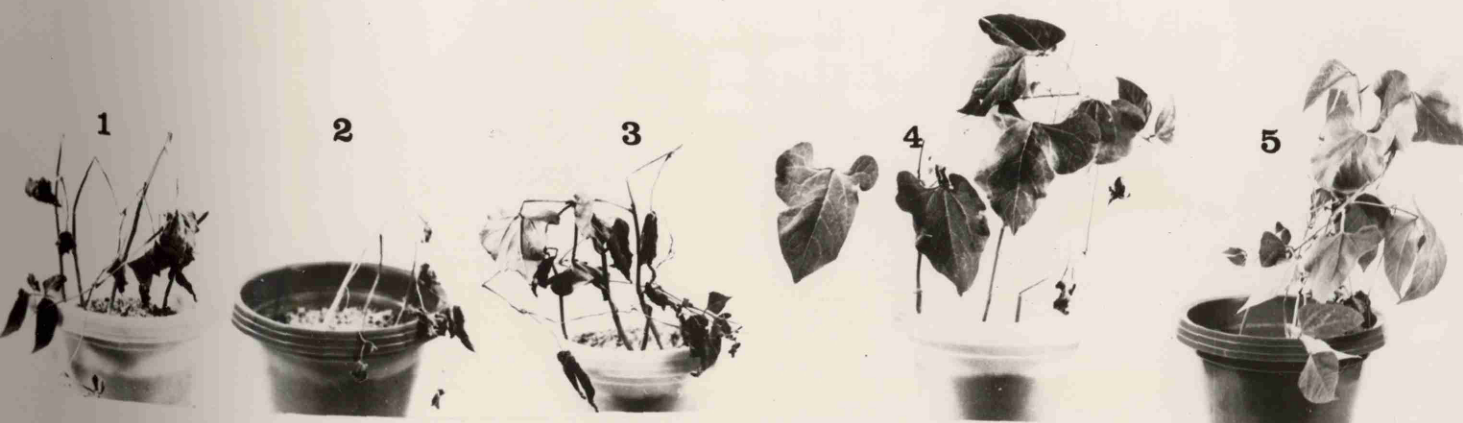
b. Sensibilidad a la infección.

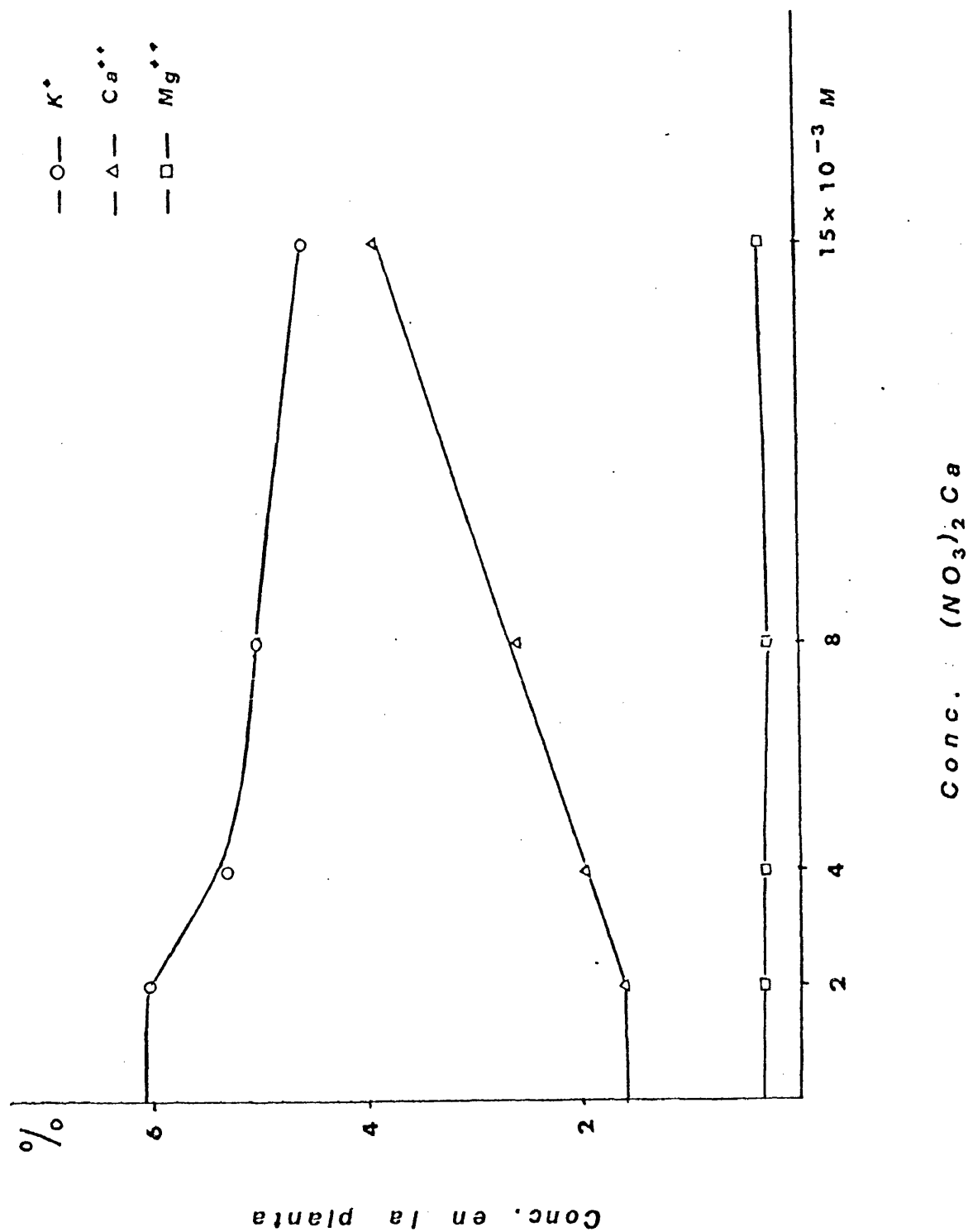
Cuando las plantas sometidas a distintos tratamientos con $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ se inoculan con la bacteria E. carotovora, su comportamiento ofrece un notable interés. La Fig. 42 refleja el resultado del experimento, por el que podemos admitir que las plantas desarrolladas en presencia de concentraciones de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ superiores a $8 \times 10^{-3}\text{M}$ muestran un carácter resistente frente E. carotovora, que no acusa el resto del experimento, ya que a concentraciones por debajo de la mencionada existe una marcada sensibilidad al ataque por la bacteria, tan marcada que la planta enferma a las 24 - 48 horas con lesiones que se van generalizando hasta ocasionar una total destrucción.

Por lo tanto, el calcio parece tener alguna intervención en el sistema de defensa que desarrolla la planta.

Fig. 41.- Aspecto de plantas de judia que se desarrollan en un mismo medio, pero con distintas concentraciones de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ (de izq. a dcha.: 0; 2×10^{-3} ; 4×10^{-3} ; 8×10^{-3} y $15 \times 10^{-3}\text{M}$.

Fig. 42.- Aspecto de plantas de judia que se desarrollan en un mismo medio, pero con distintas concentraciones de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ y despues de haber sido infectadas con Erwinia carotovora (de izq. a dcha.: 0; 2×10^{-3} ; 4×10^{-3} ; 8×10^{-3} y $15 \times 10^{-3}\text{M}$).





- Contenido en potasio, calcio y magnesio en el tejido de Ph. vulgaris L. desarrollado en presencia de concentraciones crecientes de $(\text{NO}_3)_2 \text{Ca}$.

c. Absorción de potasio, calcio y magnesio.

El contenido en K^+ y Ca^{++} y Mg^{++} del tejido vegetal se realizó en los diferentes lotes de plantas por el método ya descrito anteriormente. La Fig. 43 muestra como el calcio incorporado por los tejidos de las plantas guarda una relación directa con el calcio contenido en los distintos medios nutritivos empleados. También es de destacar que junto al aumento progresivo de la concentración de calcio, se presenta una disminución en lo que se refiere al contenido de potasio en el vegetal, sin embargo, el magnesio no presenta ninguna modificación y su concentración en la planta se mantiene prácticamente constante, pese a las distintas concentraciones de calcio en el medio donde se desarrolla.

d. Contenido en compuestos orgánicos.

1. Azúcares libres.

Los numerosos análisis cromatográficos que hemos realizado, nos han presentado como azúcares libres, componentes del tejido vegetal a, lactosa, sacarosa, galactosa, glucosa, levulosa y xilosa.

La Fig. 44 corresponde a un cromatograma de tres plantas sanas (nº 1 - 3) y otras tres enfermas (nº 4 - 6) cultivadas con cantidades crecientes de $(NO_3)_2Ca$. Como en todas las muestras se ha procurado utilizar la misma cantidad de material vegetal, podemos señalar que las plantas sanas son más ricas en azúcares libres que las enfermas, y que estos azúcares en el tejido sano están en razón inversa al contenido en calcio del medio.

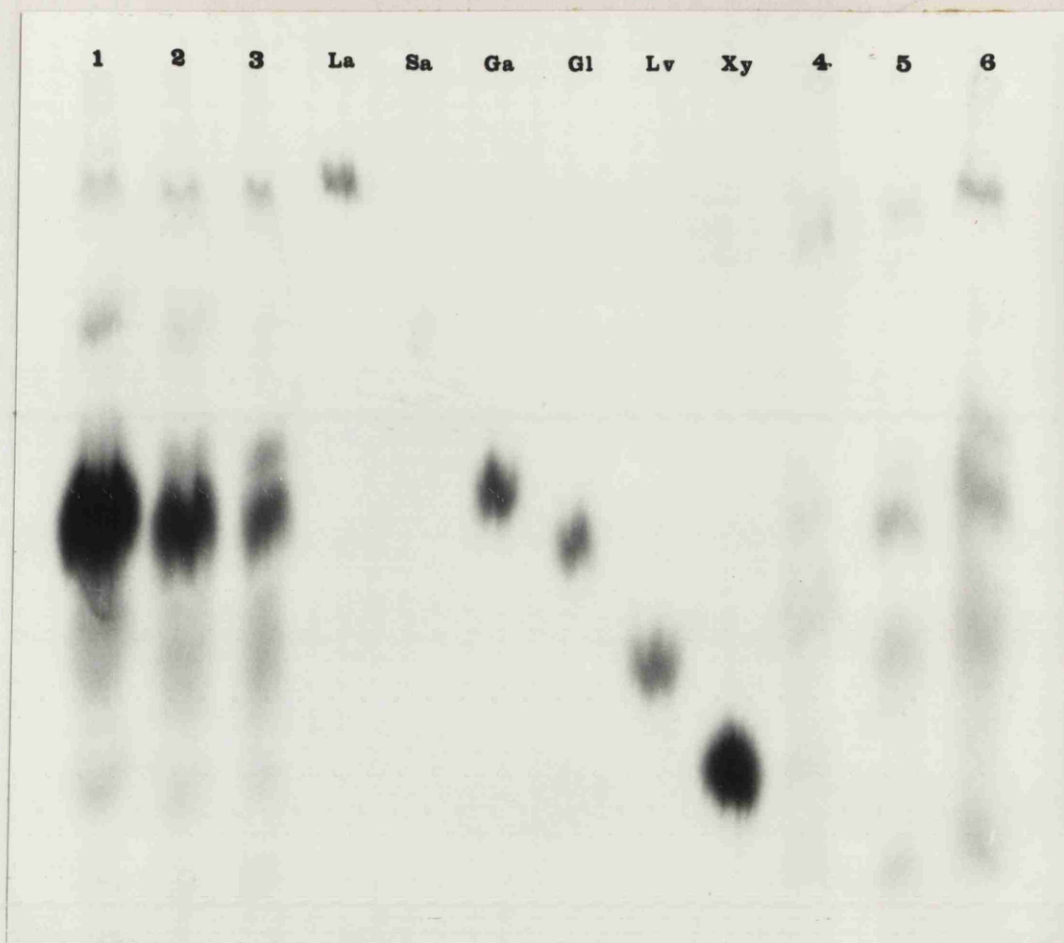


Fig. 44.- Azúcares libres, presentes en plantas sanas (1-3) y enfermas (4-6) de Phaseolus vulgaris L. desarrolladas en concentraciones crecientes de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$.

En cuanto a las plantas infectadas, hemos de hacer notar una disminución, en general, de sus azúcares con relación a las sanas. Por otra parte, cuando la planta infectada no llega a enfermar, sus azúcares alcanzan un nivel más alto que en aquellos con zonas lesionadas y destruidas, aunque manteniéndose por debajo del que corresponde a los lotes no infectados.

2. Sustancias reductoras.

El contenido de sustancias reductoras en tejidos sanos de Phaseolus vulgaris L., se mantiene dentro de los mismos valores, con independencia del porcentaje de calcio en el medio donde se desarrolla la planta. Así se refleja en la figura 45 donde todos los valores oscilan alrededor de 70 ug/g. aunque el contenido en $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ varía de 0 a $15 \times 10^{-3}\text{M}$.

En el caso de que los tejidos hayan sido infectados por E. carotovora, su contenido en sustancias reductoras tiene valores que no difieren mucho de los que corresponden al tejido sano, sobre todo cuando la planta se desarrolla en un medio con altas concentraciones de Ca. En los casos en que estas concentraciones de calcio no llegan a 10^{-2}M , se observa una tendencia a disminuir las sustancias reductoras, que llegan a mostrar valores hasta de 45 ug/g. (Fig. 46).

3. Sustancias pécticas.

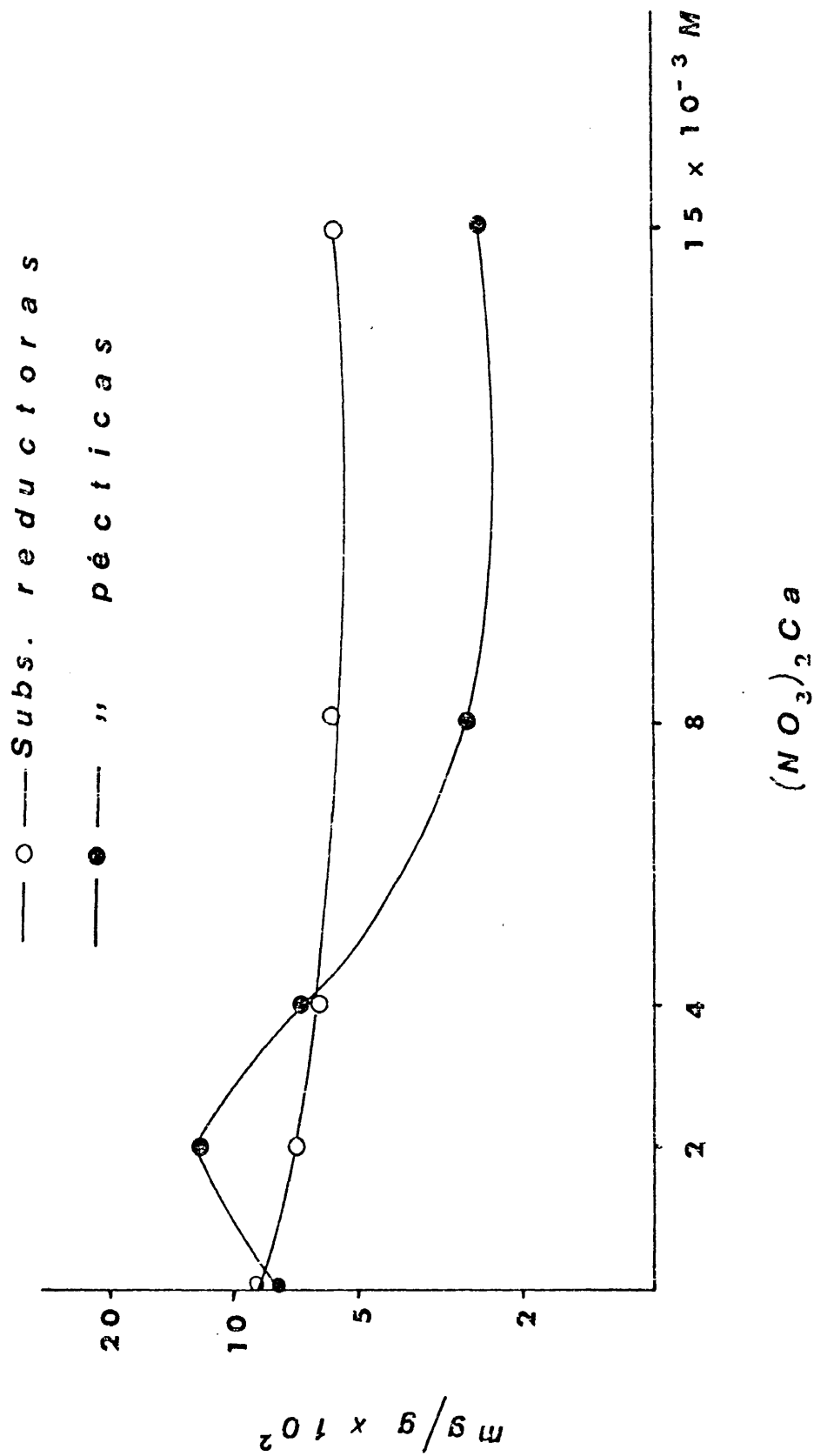
El papel estructural de las sustancias pécticas como constituyentes de la pared celular, y la intervención directa del ión Ca^{++} en la formación de

diversos compuestos pécticos, hacen de gran interés los resultados que hemos obtenido a partir de los correspondientes análisis.

En la Fig. 45 podemos ver como para una concentración de calcio de $2 \times 10^{-3}M$, se origina un máximo en el contenido de estos compuestos celulares, para inmediatamente emprender un fuerte descenso hasta $8 \times 10^{-3}M$ donde se atenúa notablemente y de esta forma alcanza el punto correspondiente a $15 \times 10^{-3}M$ de $(NO_3)_2 Ca$ en el medio.

Si ahora nos dirigimos a la Fig. 46, donde se representan los resultados de los análisis referentes a dichas plantas infectadas con E. carotovora, vemos como el aumento en el contenido de sustancias pécticas se realiza de una forma suave y progresiva en los tejidos infectados, paralelamente al incremento en la concentración de calcio que se da en el medio.

.../



. 45.- Contenido en sustancias pécticas y sustancias reductoras del tejido sano de Ph. vulgaris L.

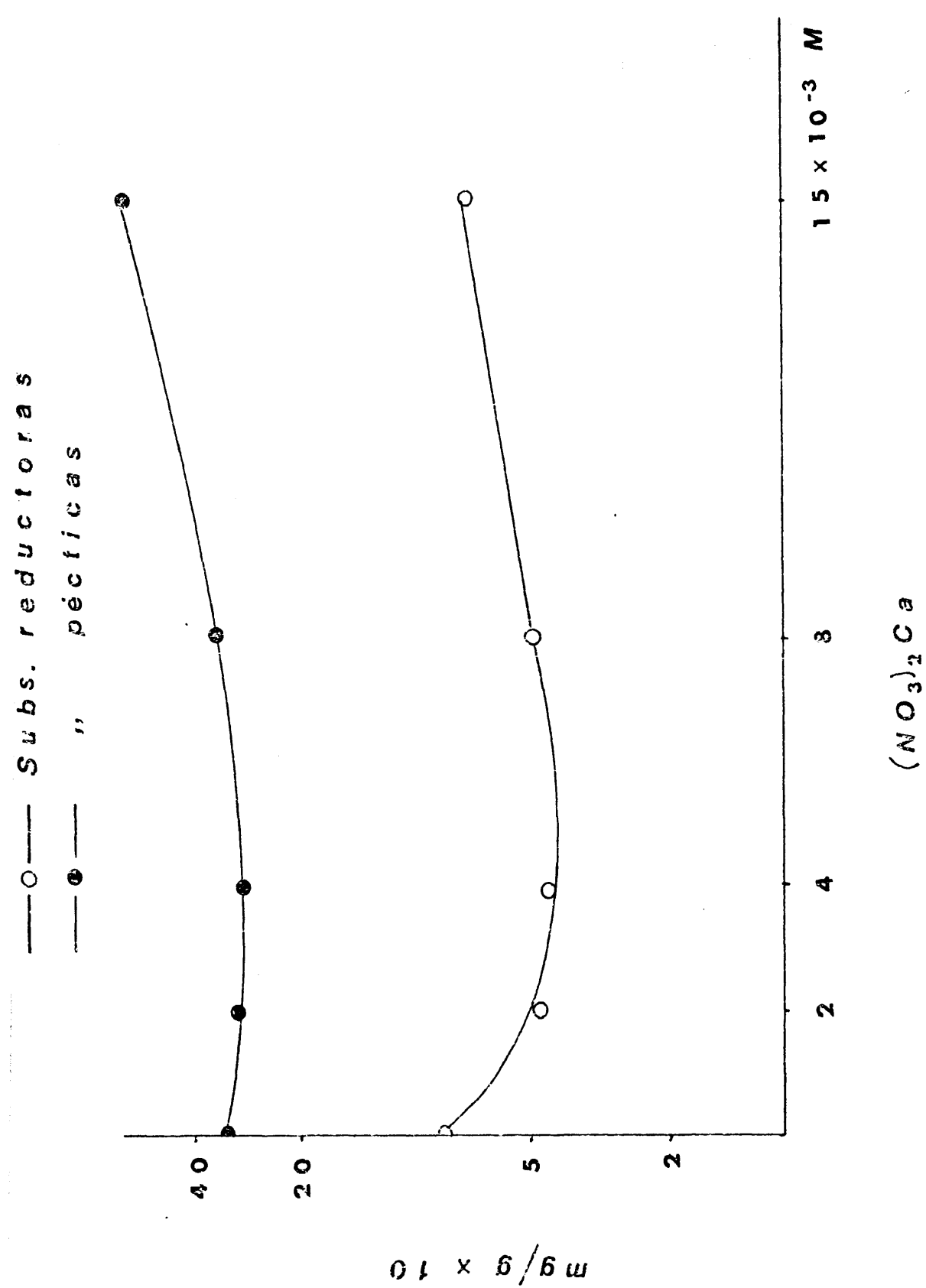


Fig. 46.- Contenido en sustancias péclicas y sustancias reductoras en Ph. vulgaris L. infectada con E. carotovora.

4. Aminoácidos libres.

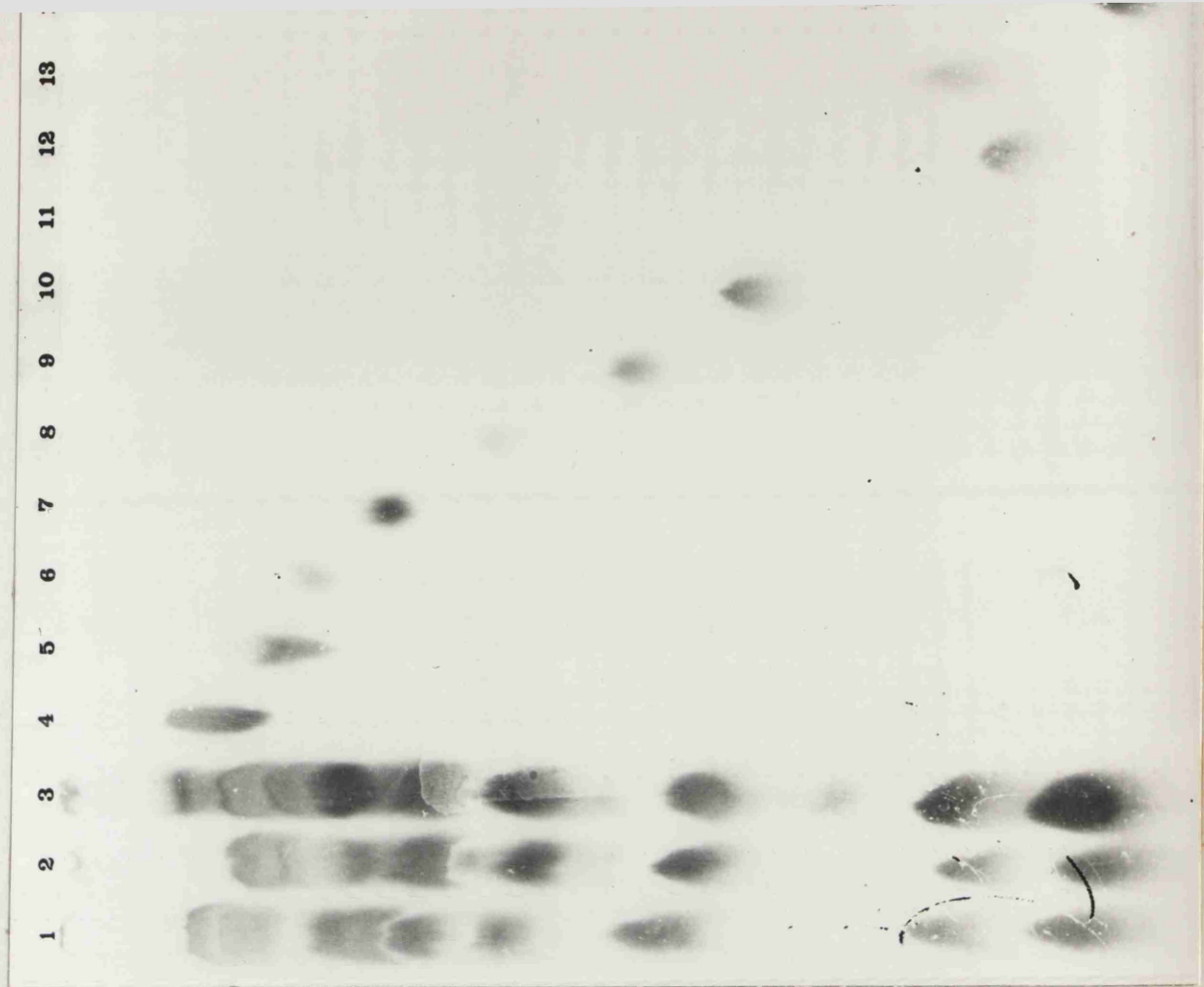
De la misma forma que en la experiencia de potasio, aquí también vamos a exponer primeramente los resultados consiguientes a los diversos estudios cromatográficos que se han efectuado. Los correspondientes a la cromatografía en placa fina y sobre papel aparecen condensados en las Figs. 47 y 48, que representan respectivamente las secuencias de plantas sin inocular y después de ser infectadas. La diferencia fundamental entre ambas no estriba en la presencia de diferentes clases de aminoácidos, sino principalmente en la mayor o menor concentración en que se encuentran presentes en la muestra.

Por ello, el analizador de aminoácidos vino a resolver y aclarar este problema, ya que mediante las pruebas efectuadas en él obtuvimos resultados cuantitativos precisos, que se reflejan en las gráficas de las Figs. 49 - 54.

Para la interpretación de estas gráficas es preciso tener en cuenta que se han obtenido a partir de concentraciones de material que no son idénticas para todas las muestras, ya que por ser distinta su riqueza en aminoácidos, la técnica exige utilizar cantidades comprendidas entre determinados límites. Por esta causa, y con el fin de hacer más fácil la interpretación, presentamos la table número 2, en la que aparecen las cantidades de aminoácidos referidas a 50 mg. de tejido vegetal. Puede verse por ella que con excepción de lisina y arginina, todos los demás aminoácidos disminuyen en los tejidos

Fig. 47.- Análisis cromatográfico de aminoácidos en plantas de judía sana, desarrolladas en medios con 0; 4×10^{-3} y 15×10^{-3} M de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$. (Los números 4 - 14 corresponden a testigos).

Fig. 48.- Análisis cromatográfico de aminoácidos existentes en plantas de judía enferma, desarrolladas en medios con concentraciones crecientes de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$.



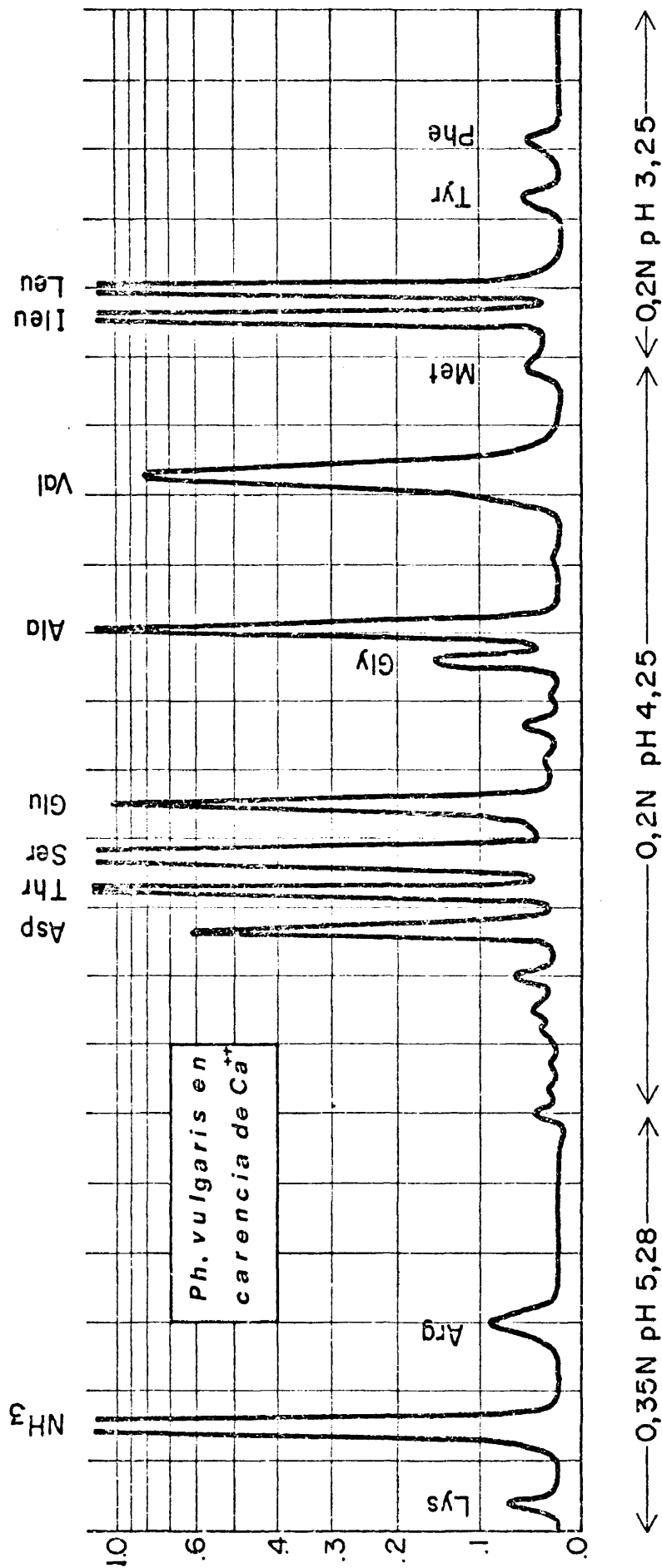


Fig. 49.- Análisis cromatográfico de aminoácidos de Ph. vulgaris L. en un medio carente de calcio.

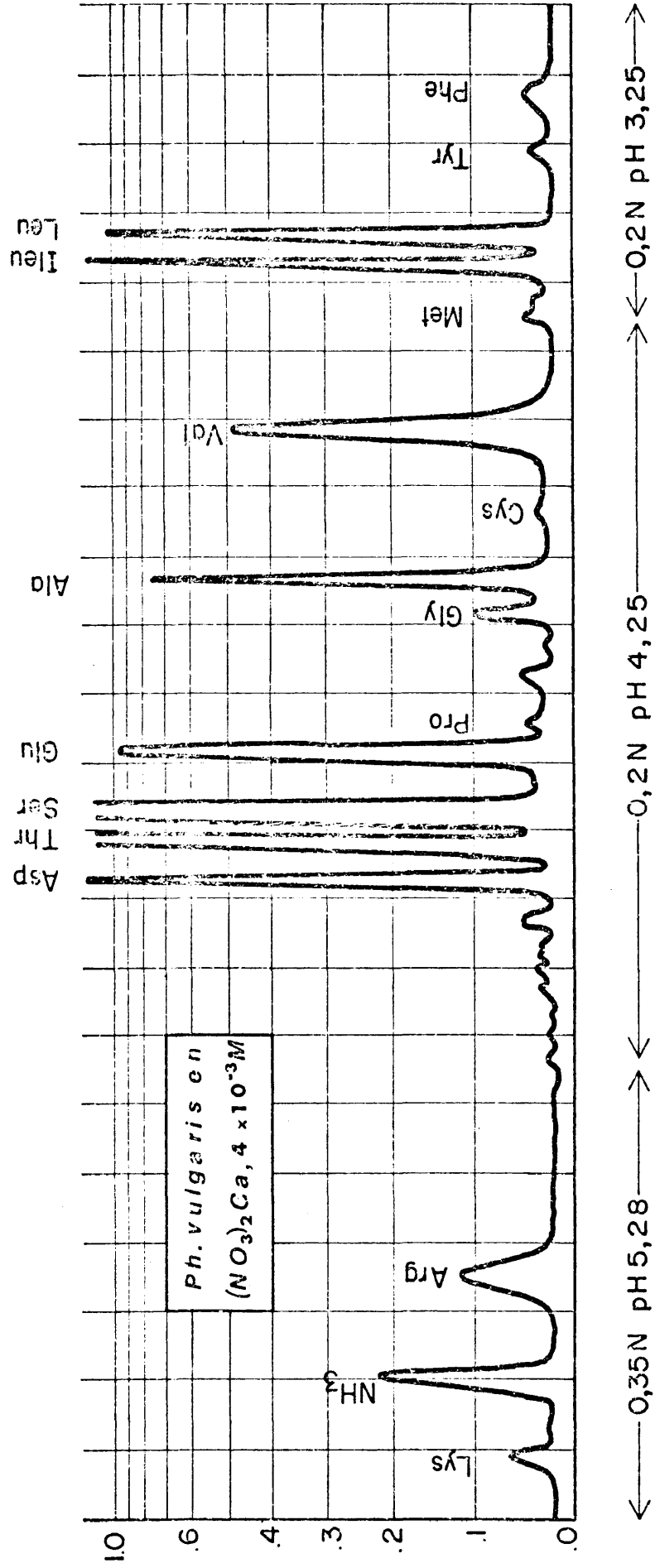


Fig.50-Análisis cromatográfico de aminoácidos de *Ph. vulgaris* L. en presencia de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$, $4 \times 10^{-3}\text{M}$.

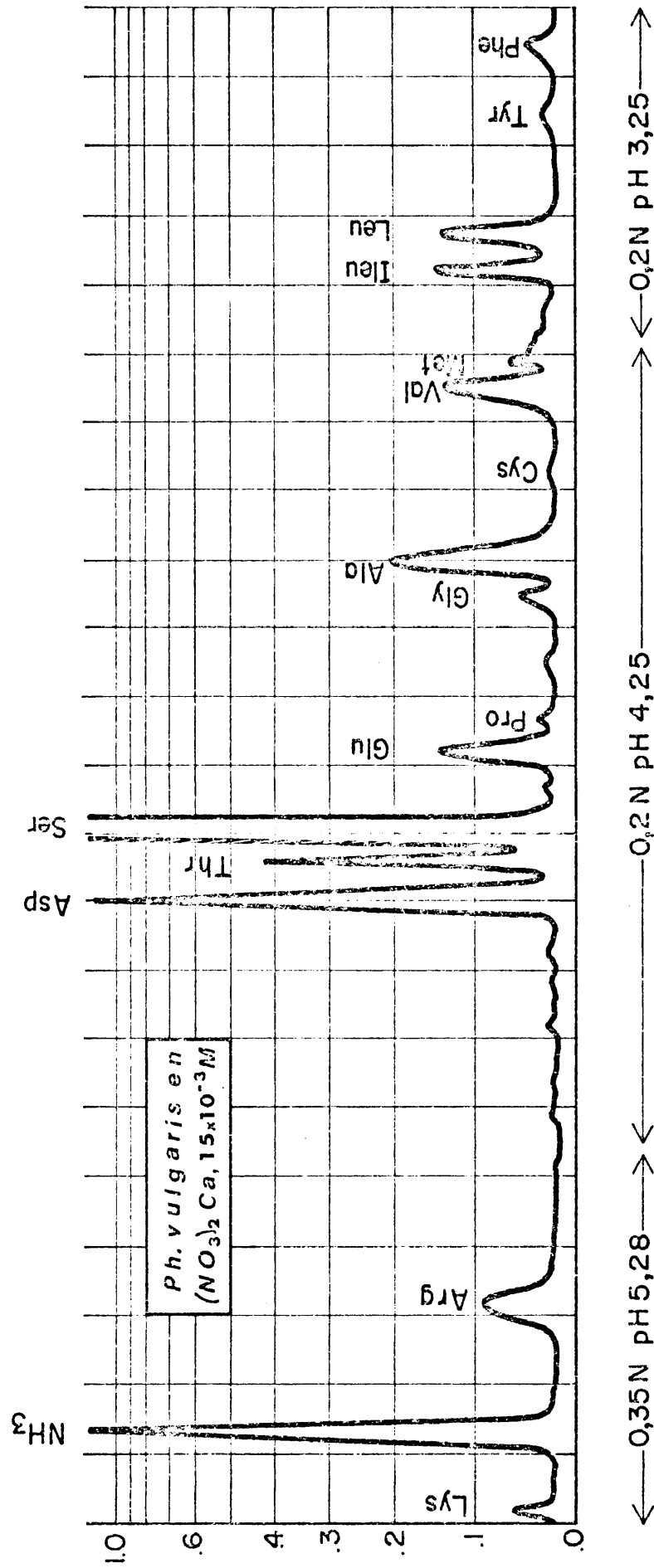


Fig.51. - Analisis cromatográfico de aminoácidos de Ph. vulgaris L. en presencia de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ 10^{-3}M .

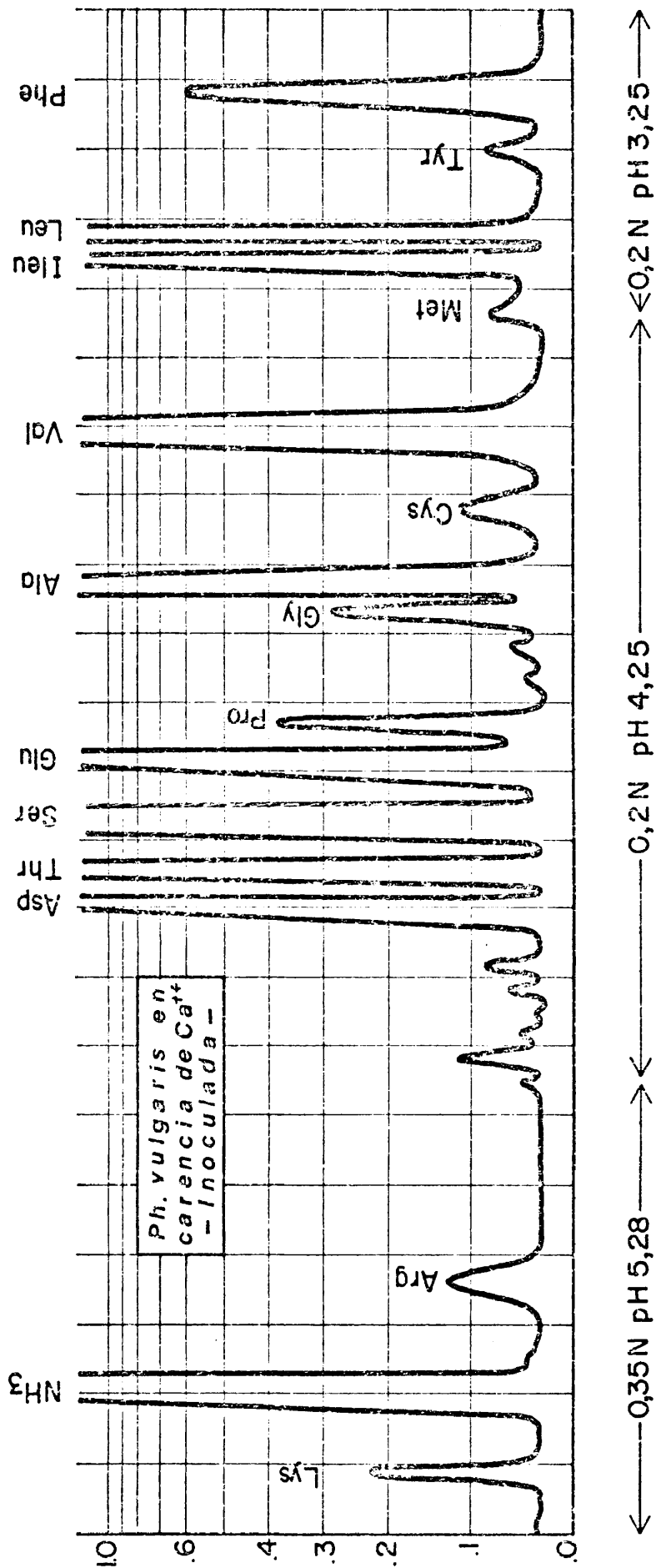


Fig. 52.- Analisis cromatográfico de aminoácidos de *Ph. vulgaris* L. enferma, en un medio carente de calcio.

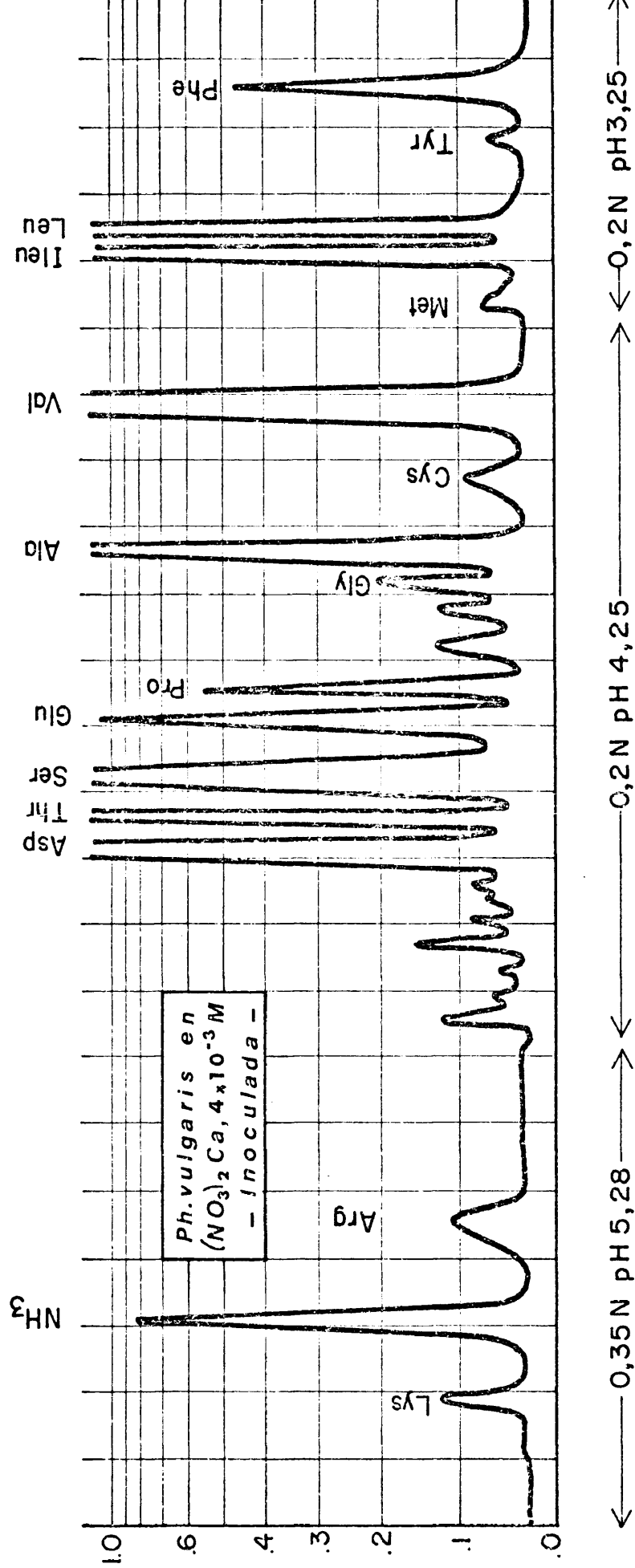


Fig. 53.- Análisis cromatográfico de aminoácidos de *Ph. vulgaris* L. enferma, en un medio con $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$, $4 \times 10^{-3}\text{M}$.

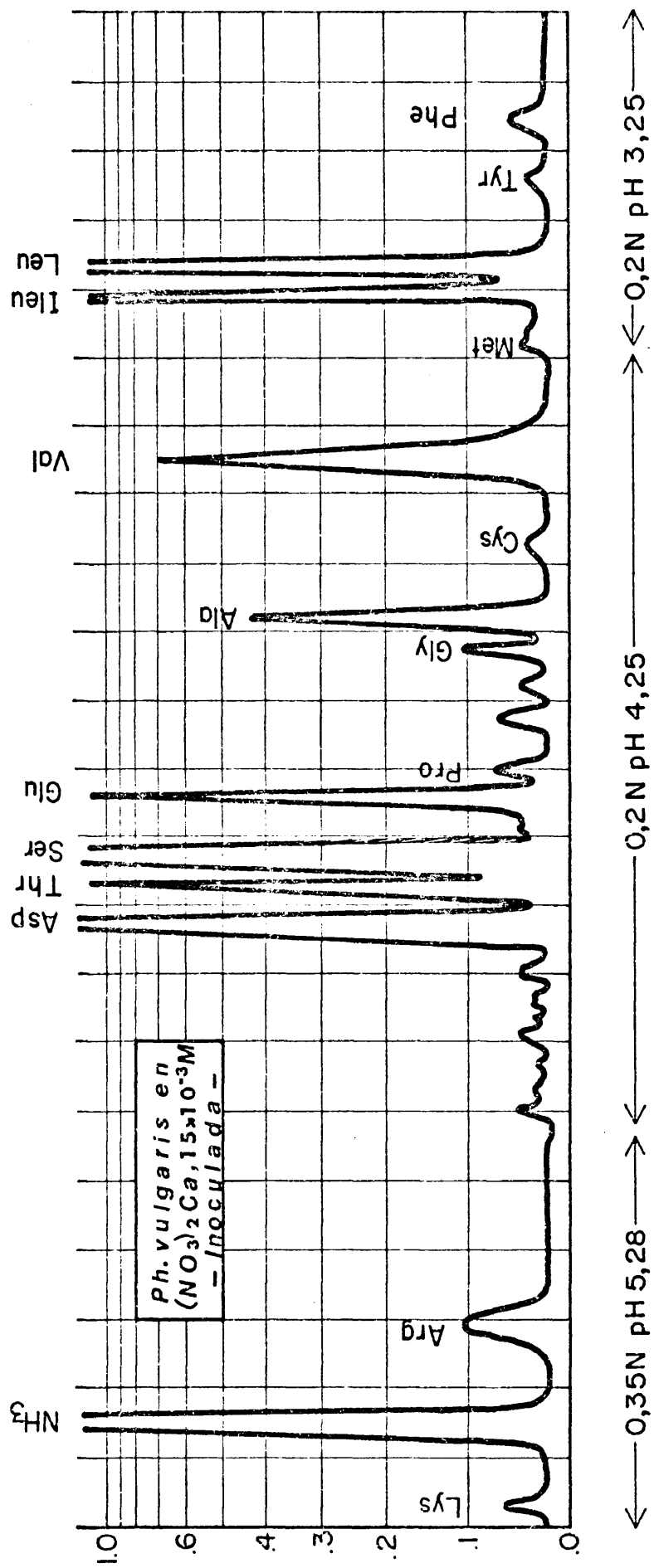


Fig. 54.- Análisis cromatográfico de aminoácidos de *Ph. vulgaris* L., enferma, en un medio con (NO₃)₂Ca, 15 x 10⁻³M.

Tabla nº 2

Aminoácidos existentes en 50 mg. de tejido fresco de Phaseolus vulgaris sano (S) y enfermo (E) cuando se desarrolla en un medio con diferentes concentraciones de $(NO_3)_2 Ca$.

Conc. de $(NO_3)_2 Ca$ (M)	0		4×10^{-3}		15×10^{-3}	
Estado del tejido	S	E	S	E	S	E
Lisina	0.0089	0.0459	0.00948	0.0252	0.0133.	0.0128
Histidina	-	-	-	-	-	-
NH ₃	0.3130	1.851	0.391	1.141	0.348	1.321
Arginina	0.0459	0.0927	0.0992	0.0885	0.0724	0.0898
Ac. aspártico	0.1091	0.260	0.1484	0.265	0.1091	0.356
Treonina	0.1607	0.1941	0.1489	0.141	0.0561	0.1398
Serina	0.6784	1.510	0.801	1.541	0.287	0.809
Ac glutámico	0.0958	0.321	0.104	0.183	0.0261	0.161
Prolina	0.0049	0.234	0.0781	0.239	0.000946	0.0286
Glicina	0.0243	0.0891	0.01673	0.0468	0.00906	0.0214
Alanina	0.1239	0.355	0.132	0.2038	0.0466	0.094
Valina	0.1615	0.6781	0.1329	0.416	0.0477	0.184
Isoleucina	0.1097	0.484	0.0849	0.276	0.0249	0.135
Leucina	0.1028	0.550	0.0911	0.349	0.0223	0.133
Tirosina	0.0079	0.02175	0.00652	0.0144	0.00366	0.00431
Fenilalanina	0.0084	0.1512	0.00928	0.124	0.00745	0.01161

sanos, en relación con el aumento de calcio en el medio. Cuando el tejido es enfermo, también la concentración de aminoácidos disminuye con el aumento de calcio, a excepción de ácido aspártico y prolina.

5. Nitrógeno total.

El nitrógeno total presenta en plantas de jedia sanas, sometidas al tratamiento correspondiente de calcio, se hace patente en la Fig. 55. En ella vemos como a pesar de un pequeño aumento que se produce para una concentración de $4 \times 10^{-3}M$, el contenido en nitrógeno del vegetal se mantiene dentro de unos límites muy estrechos. Esta regularidad se rompe cuando estudiamos las muestras de plantas inoculadas con el patógeno, ya que, como aparece en la Fig. 56, el mayor contenido de este elemento se da para $2 \times 10^{-3}M$ y a partir de esta concentración empieza a descender paulatinamente hasta llegar a un mínimo en $15 \times 10^{-3}M$ de $(NO_3)_2 Ca$.

El aumento general que experimenta el nitrógeno en los tejidos infectados respecto a los sanos, junto a la disminución que sufre conforme aumenta el contenido en calcio, que por otra parte es paralelo a una inhibición de los síntomas de la enfermedad, son hechos evidentes que habrá que considerar posteriormente.

.../

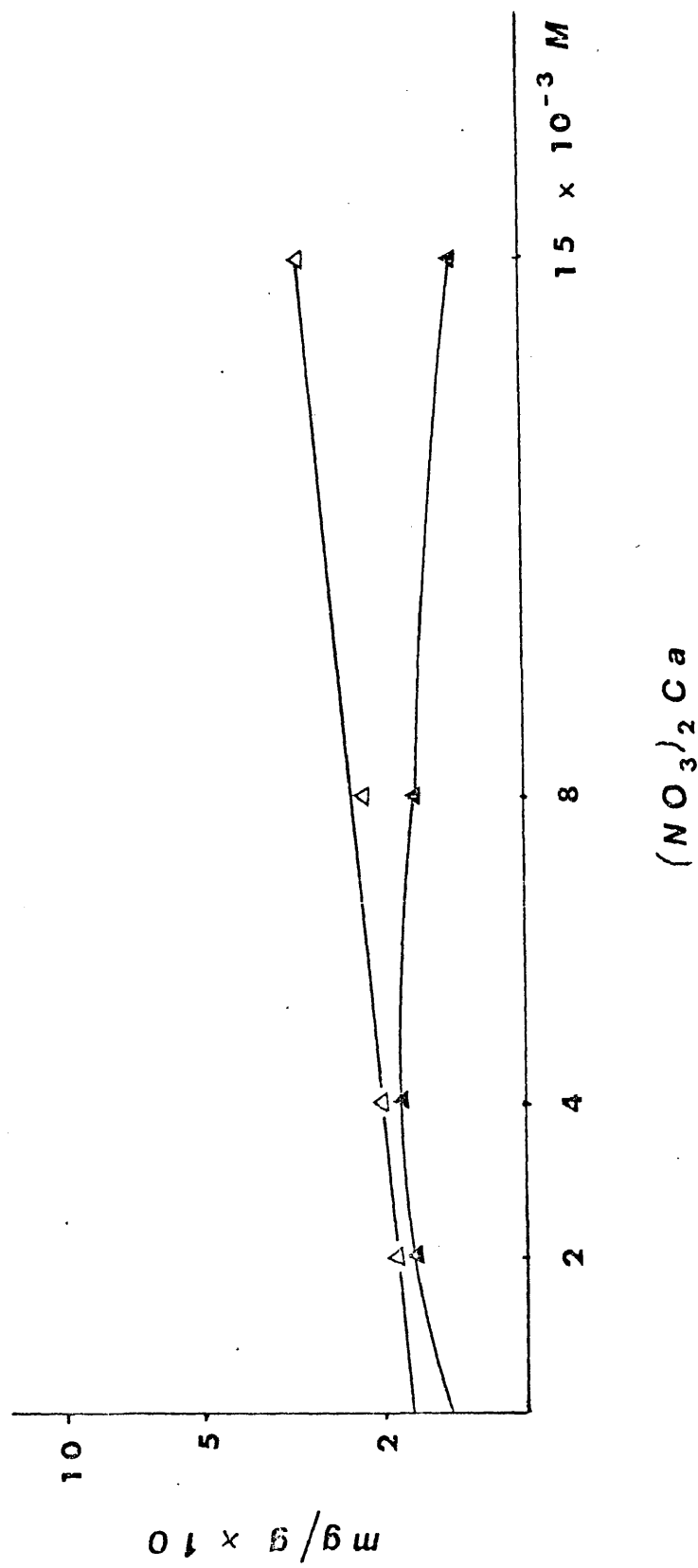


Fig. 55.- Contenido de nitrógeno y proteínas en plantas sanas de judía, desarrolladas sobre concentraciones crecientes de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$.

—△— Nitrogeno

—△— Proteina

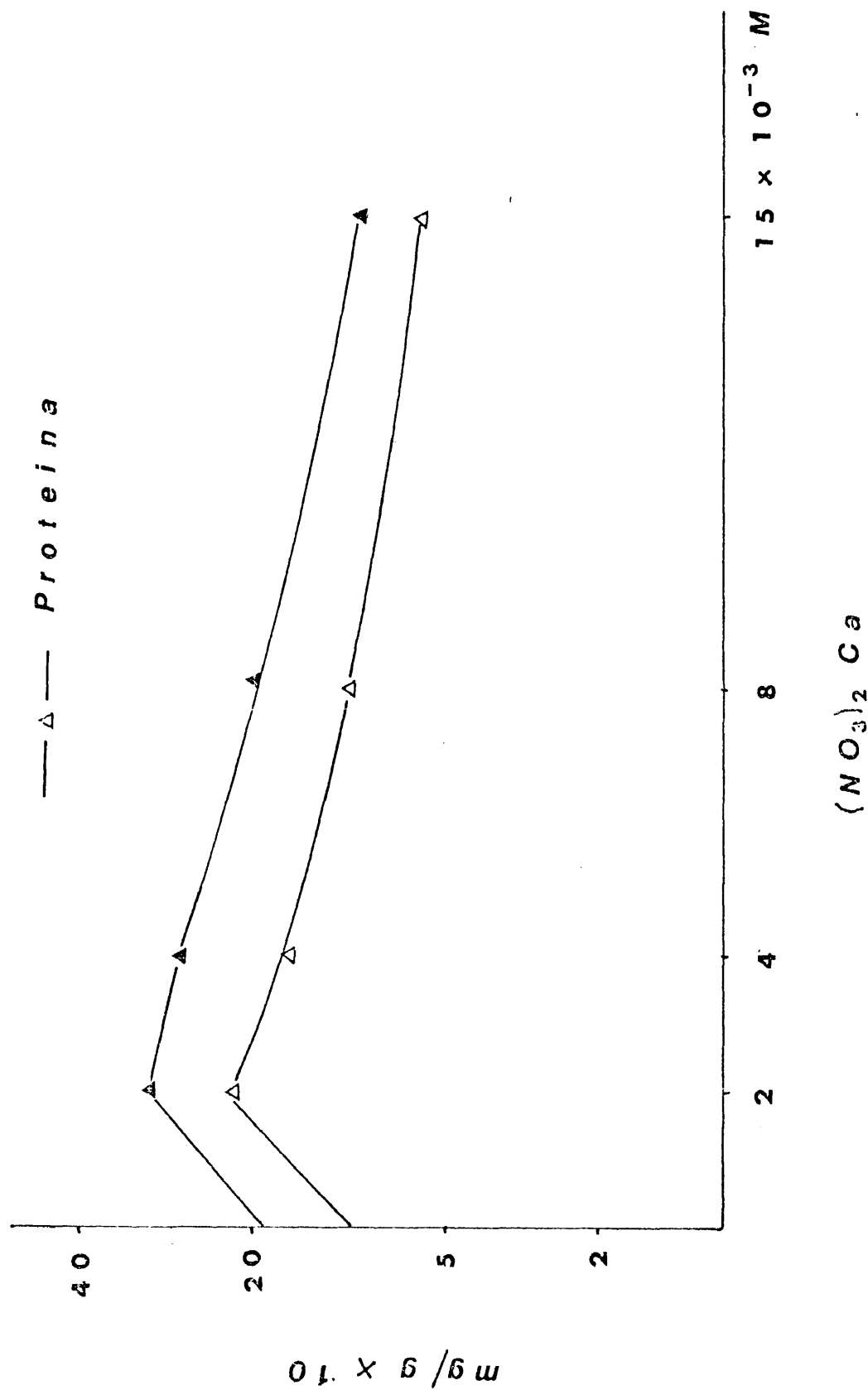


Fig. 56.- Contenido de nitrógeno y proteínas en plantas enfermas de judía, desarrolladas sobre concentraciones crecientes de $(NO_3)_2 Ca$.

6. Proteínas.

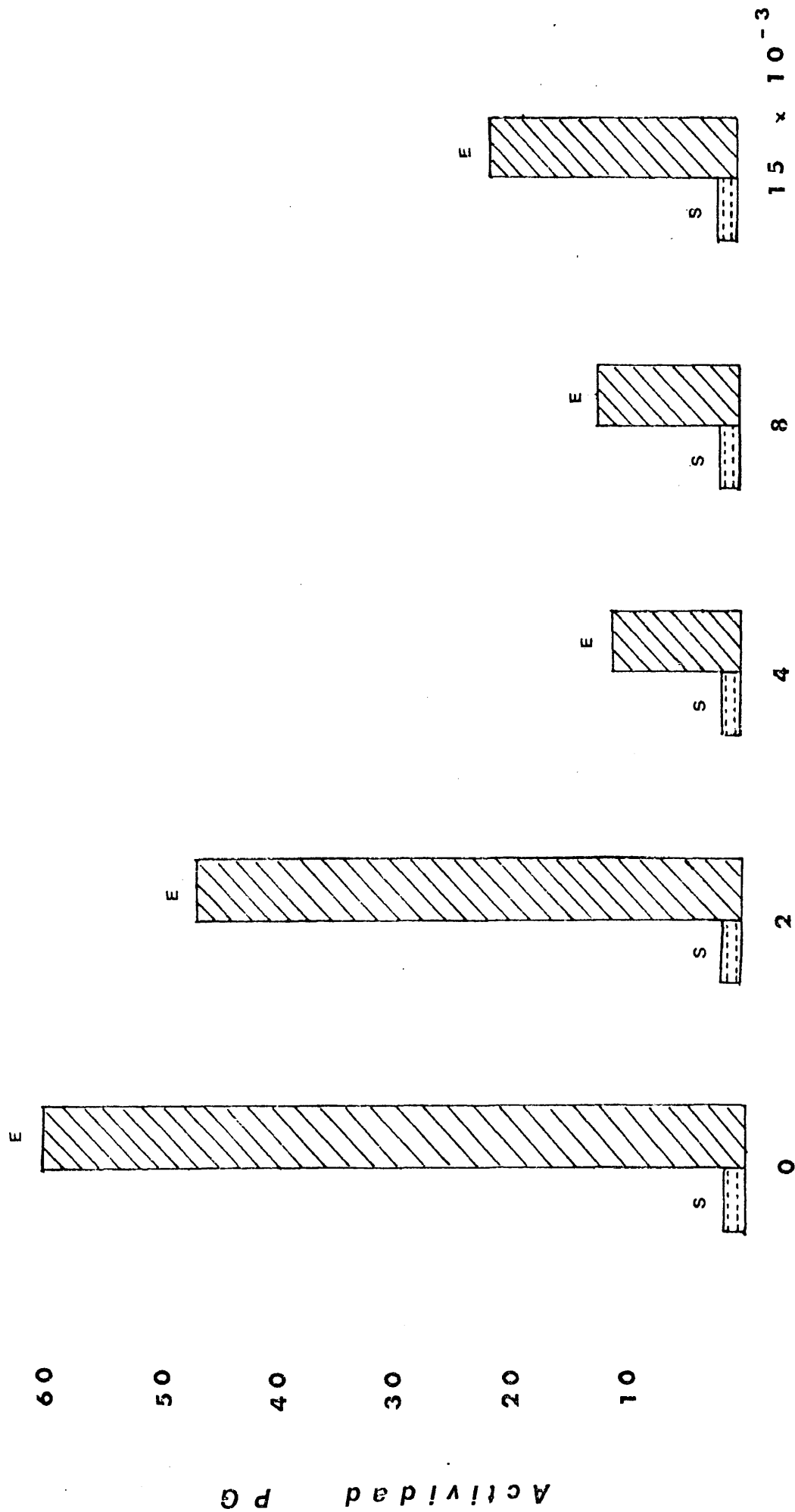
Como aparece en la Fig. 55, la concentración de proteínas en el tejido de plantas de judía, ofrece muy ligeras variaciones con relación a la cantidad de calcio existente en el medio donde se cultivan, solo podemos señalar un aumento muy ligero en proporción directa al calcio.

Cuando se trata de plantas enfermas, puede observarse en la Fig. 56 un paralelismo entre el contenido en proteínas y en nitrógeno, con relación a la concentración de calcio en el medio. Existe una mayor cantidad de proteína para la concentración $2 \times 10^{-3}M$ de $(NO_3)_2Ca$, y para mayores concentraciones aparece una disminución paulatina pero continua.

e. Síntesis de enzimas pectolíticas.

Como nota común a la dotación enzimática de Phaseolus vulgaris L., hemos de señalar que en las condiciones y fase de desarrollo que es utilizada, no se ha observado una actividad destacable de enzimas pectolíticas, que por el contrario aparece en el caso en que la planta haya sido infectada por E. carotovora.

1. La Fig. 57 corresponde a la valoración de poligalacturonasa y, como puede verse, presenta valores para el tejido enfermo que son más elevados cuanto más bajos los niveles de calcio en el medio.



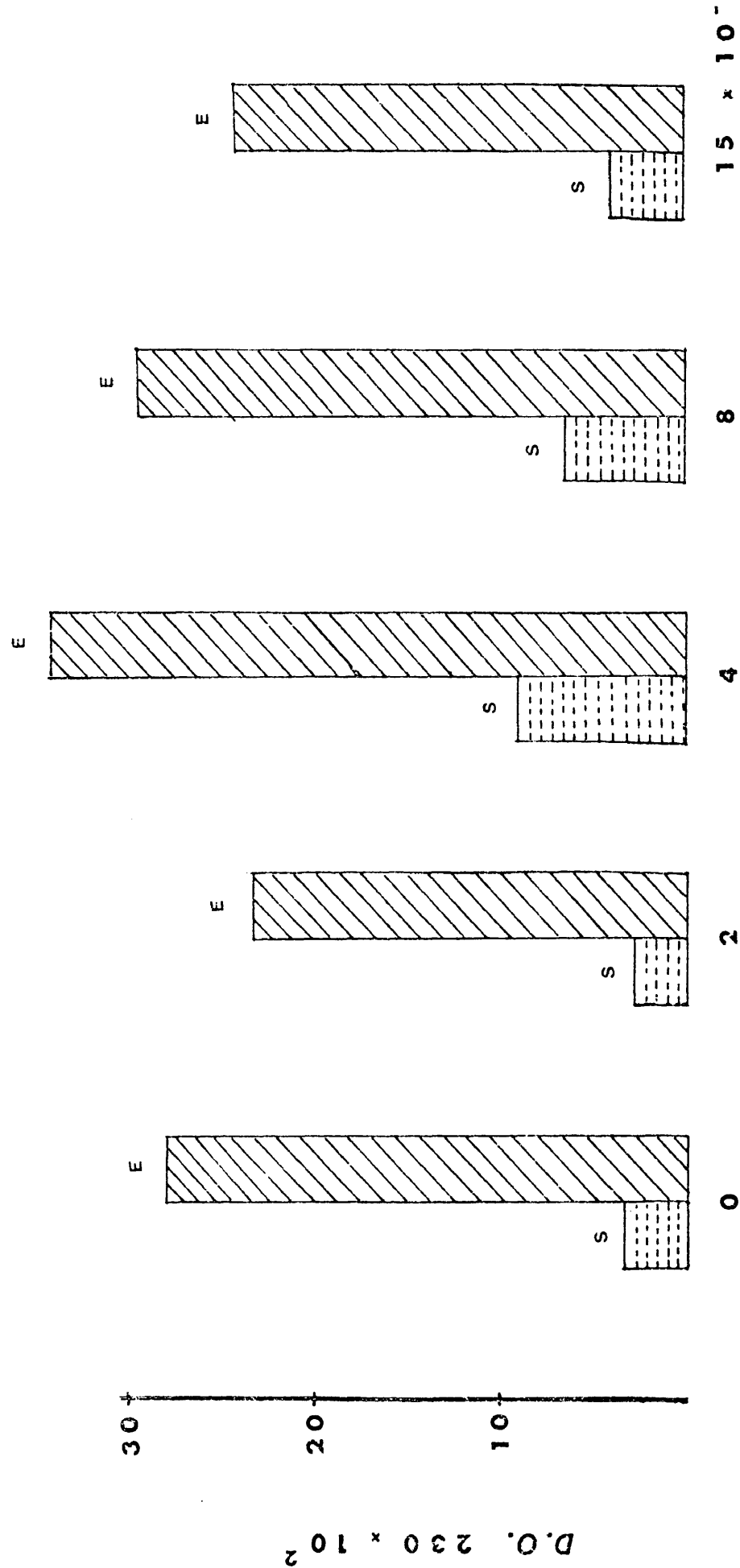
Concentración de $(NO_3)_2Ca$

Fig. 57. - Determinación de PC, en plantas de judía sanas (s) y enfermas (e), desarrolladas en un medio con concentraciones crecientes de $(NO_3)_2Ca$.

2. Por el contrario, la enzima traseliminativa PATE aparece cuando la planta está enferma, en cantidades que oscilan entre límites muy próximos, sin que guarden relación con la proporción de calcio disponible en el medio (Fig. 58).

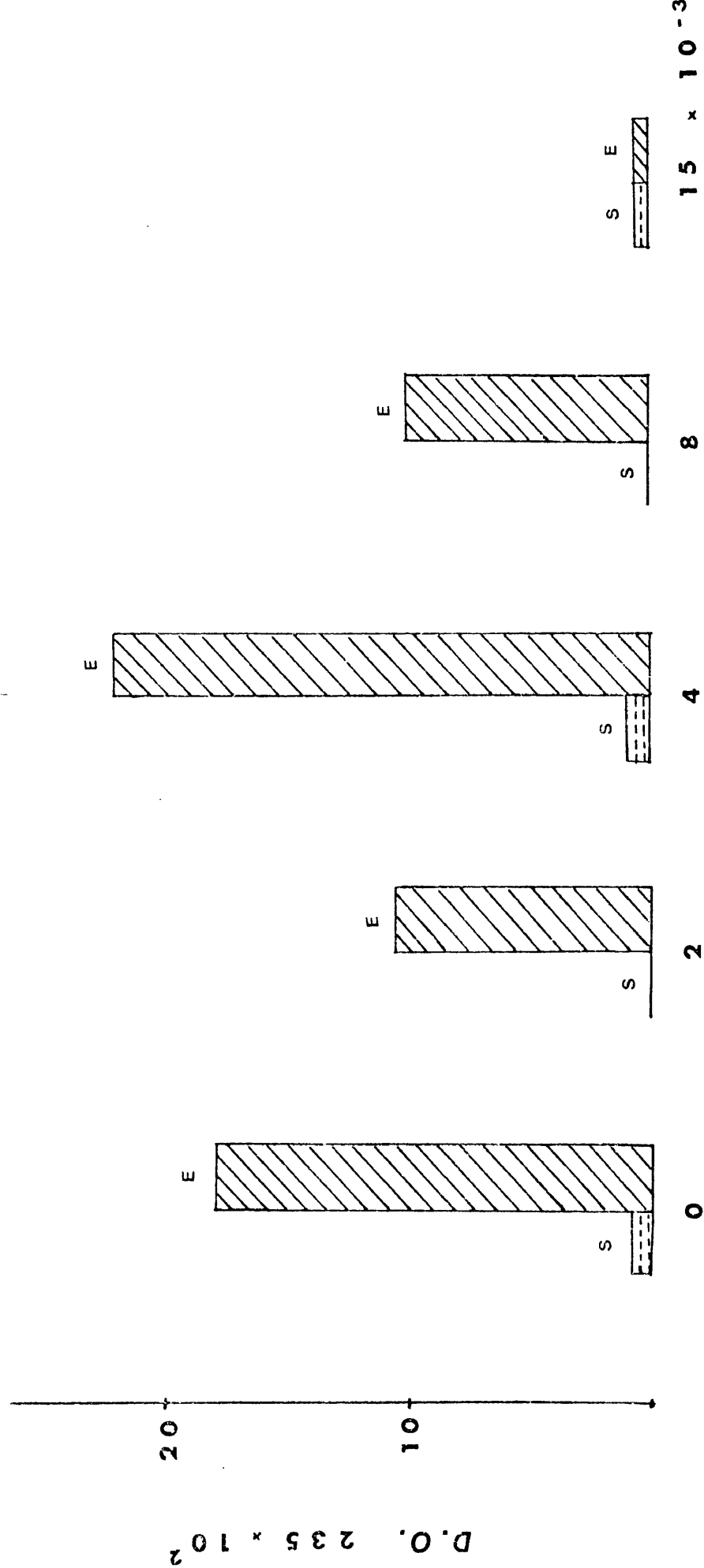
3. La Fig. 59 muestra los resultados de la determinación de PTE, en plantas de judía desarrolladas en medios con diferentes concentraciones de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$. Está claro que la influencia del calcio no está estrechamente vinculada a su concentración, aunque cabe resaltar que una molaridad en $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ de $15 \times 10^{-3}\text{M}$ produce inhibición de la enzima en los tejidos enfermos.

.../



Concentración de (NO₃)₂Ca

Fig. 58. - Determinación de PATE, en plantas de judía sanas (s) y enfermas (e), desarrolladas en un medio con concentraciones crecientes de (NO₃)₂Ca.



Concentración de $(NO_3)_2Ca$

Fig. 59.- Determinación de PTE en plantas de judía sanas (s) y enfermas (e), desarrolladas en un medio con concentraciones crecientes de $(NO_3)_2Ca$.

**F. INFLUENCIA DEL ION Mg^{2+} SOBRE EL
MICROORGANISMO PATOGENO.
ERWINIA CAROTOVORA.**

a. Crecimiento.

Para estudiar el crecimiento de Erwinia carotovora bajo la influencia de magnesio, hemos tenido que ampliar la gama de concentraciones que hasta ahora veníamos empleando en nuestras experiencias, ya que según podemos ver en la Fig. 60, este ión determina una inhibición del crecimiento bacteriano que solo llega a ser total para valores superiores a 9% de SO_4Mg en el medio.

La inhibición avanza progresivamente y así alcanza un 32% para una concentración de SO_4Mg de 6% y se acentua hasta 58% cuando la sal llega al 8% en el medio de cultivo. Cantidades bajas del elemento en cuestión no parecen modificar el crecimiento de la bacteria.

b. Síntesis de enzimas pectolíticas.

La presencia de SO_4Mg en el medio de cultivo, ocasiona una inhibición en la síntesis de enzimas pectolíticas por Erwinia carotovora.

.../

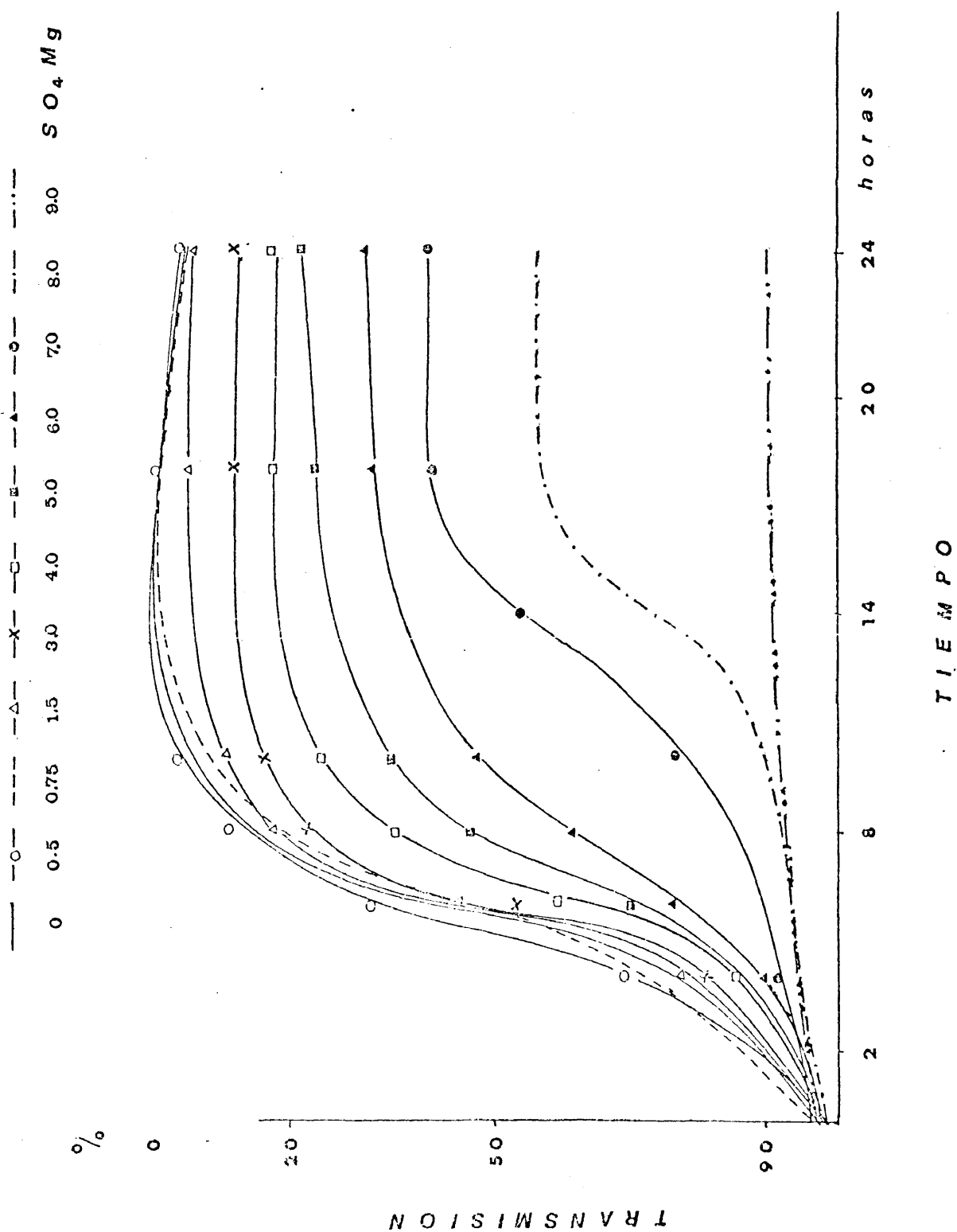


Fig. 60.- Efecto de la presencia de SO_4Mg en el crecimiento de *E. carotovora*.

1. Según la Fig. 61 basta una concentración de 0,9% de SO_4Mg para que la síntesis de PG se reduzca al 50% y cuando la sal alcanza un porcentaje de 2, la inhibición llega a un 80% respecto a la que corresponde a un cultivo en el medio normal sin adición extra de magnesio.

2. Los resultados que se obtienen en el caso de PATE son bastante similares a los que acabamos de describir. Como puede observarse en la Fig. 62 basta un 1,5% de SO_4Mg en el medio de cultivo, para que la actividad enzimática se inhiba hasta un 70%, inhibición que se acentúa bruscamente a medida que aumenta la proporción de magnesio.

3. Cuando consideramos la otra enzima transeliminativa, PTE, el efecto inhibitor que ofrece en su síntesis la presencia de magnesio queda reflejado en la Fig. 63. Es menos intenso al señalado en los casos anteriores, pero igualmente completo por incremento de dosis.

.../

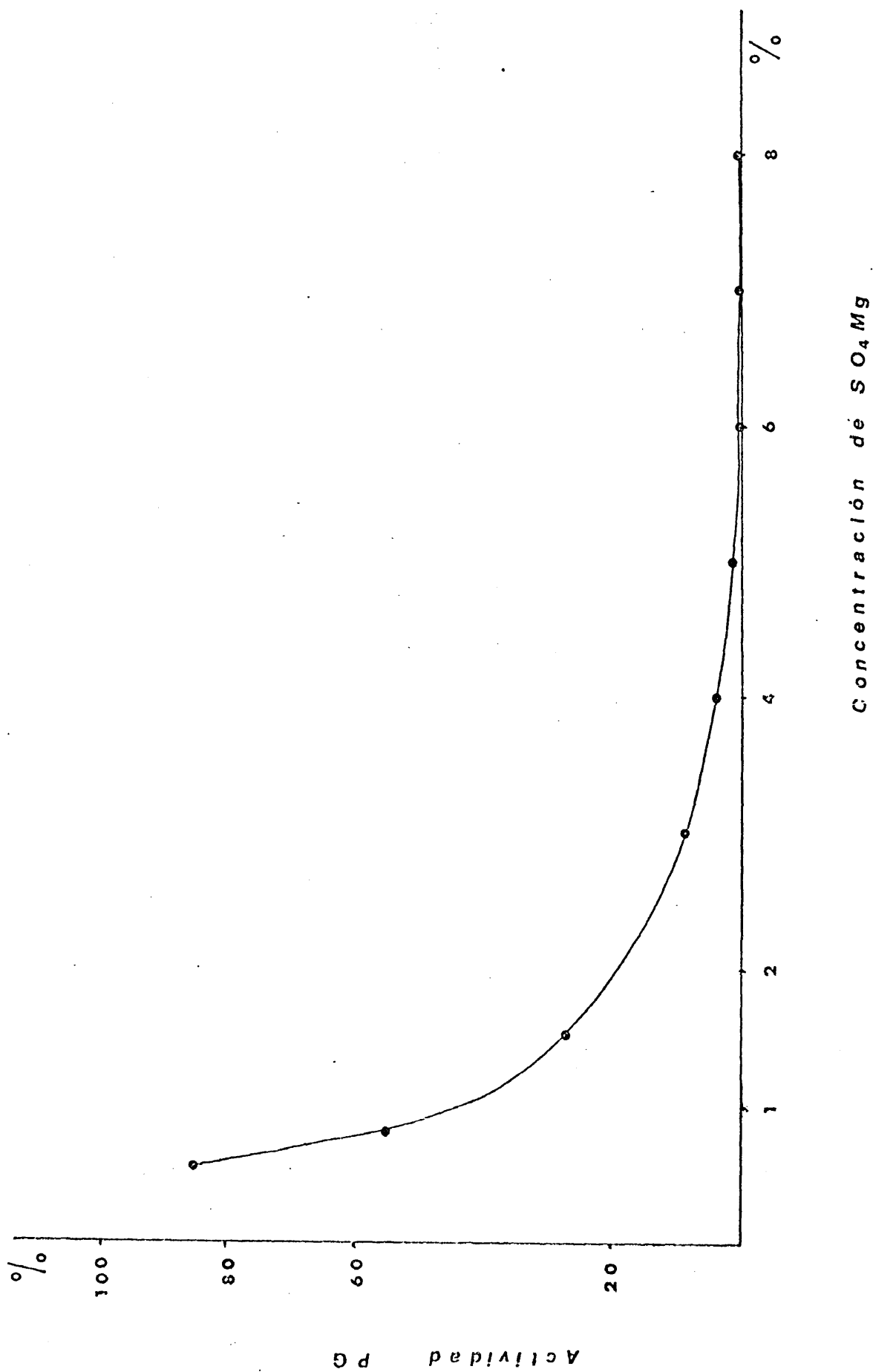
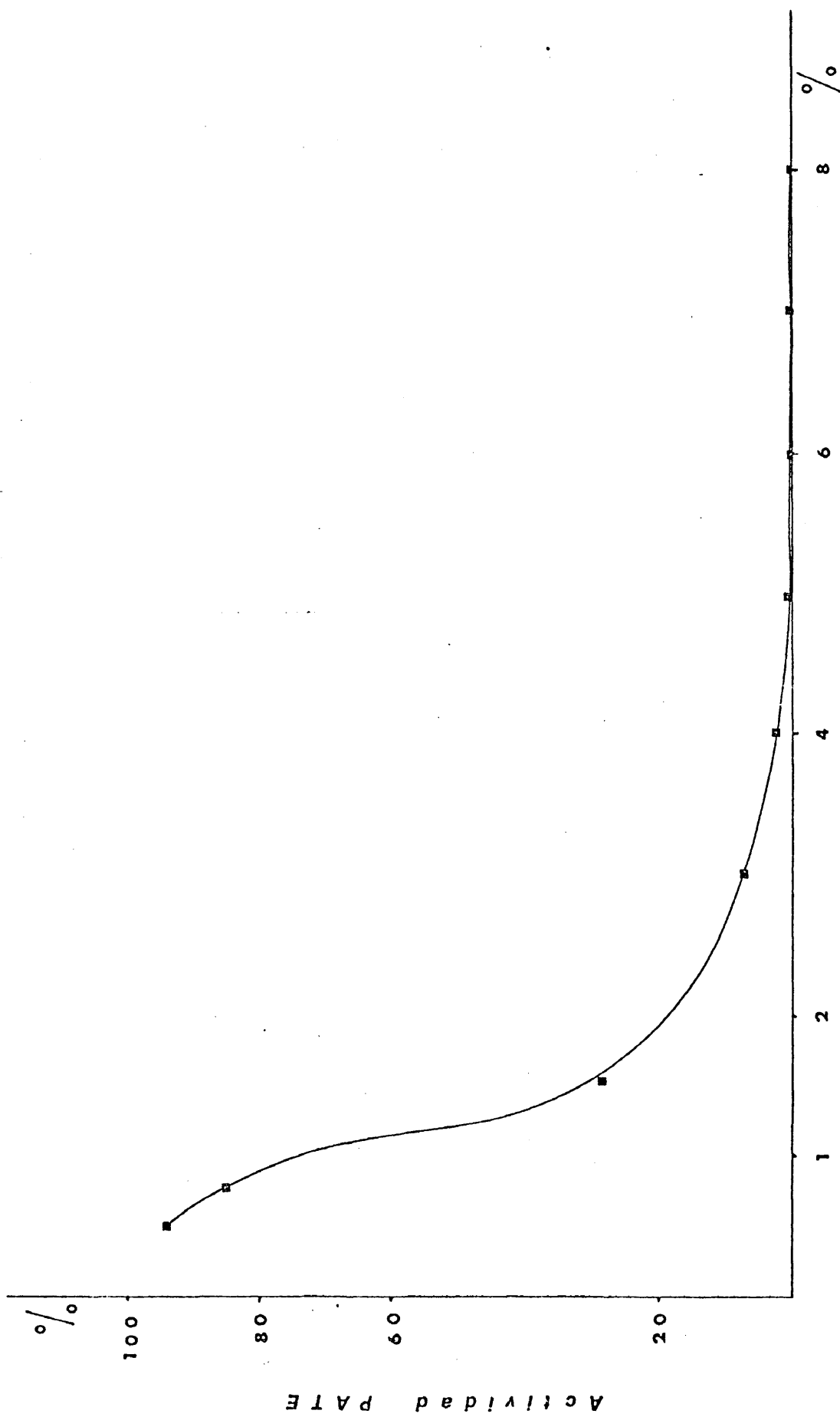


Fig. 61.- Acción de SO_4Mg sobre la síntesis de PG por E. carotovora.



Concentración de SO_4Mg

Fig. 62.- Acción de SO_4Mg sobre la síntesis de PATE por *E. carotovora*.

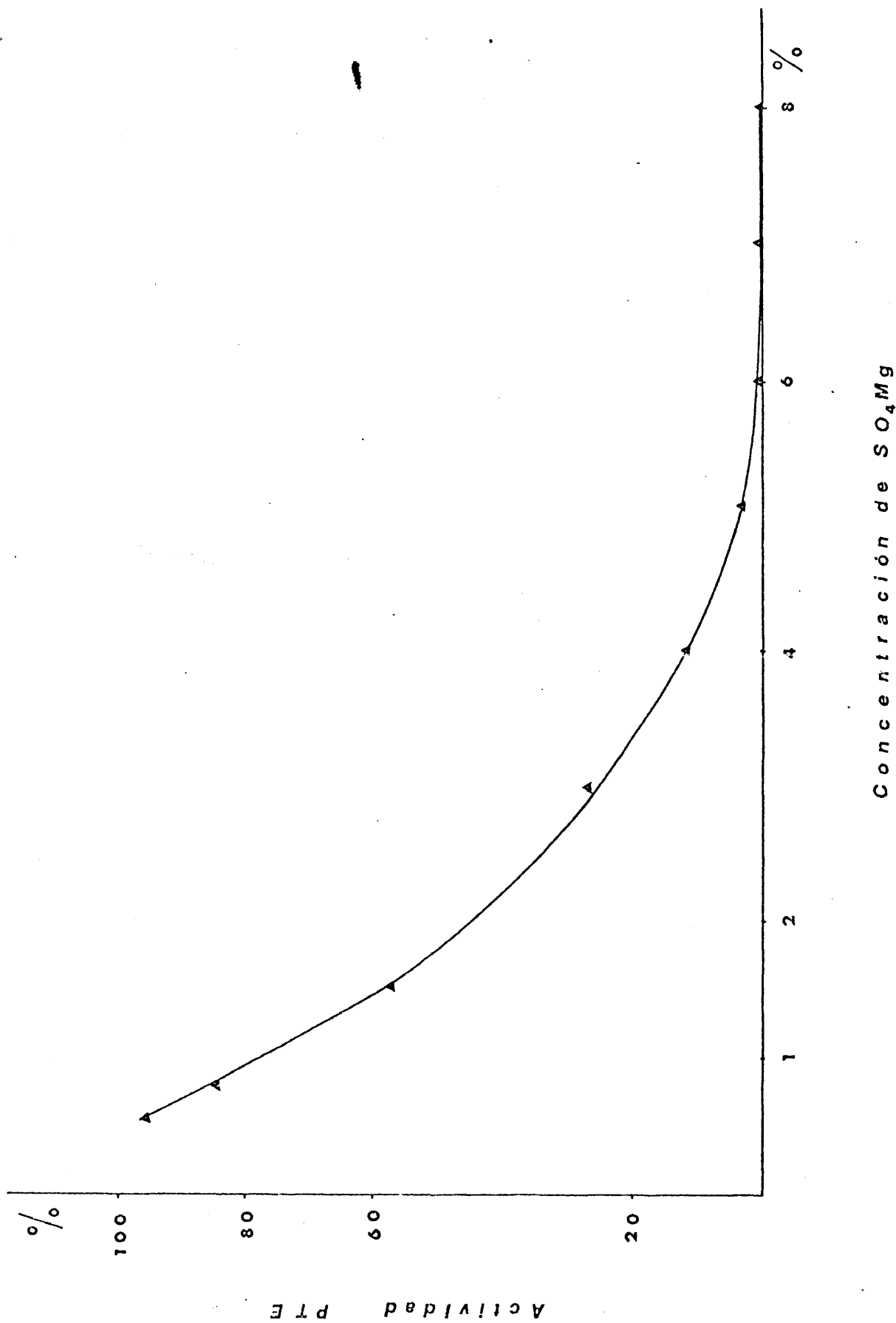


Fig. 63.- Acción de SO_4Mg sobre la síntesis de PTE por E. carotovora.

G. INFLUENCIA DEL ION Mg^{++} SOBRE LA PLANTA HUESPED, PHASEOLUS VULGARIS L.

a. Crecimiento.

El estudio sobre el crecimiento de Phaseolus vulgaris L. bajo el tratamiento de magnesio y en las condiciones y forma que ya se ha descrito, nos ha llevado a los resultados que aparecen claramente expresados en la Fig. 64. En ella vemos como entre todas las macetas se sigue un desarrollo bastante uniforme, sin ninguna alteración apreciable que afecte a la altura o al grosor del tallo o de la hoja, o en general al aspecto total de la planta.

b. Sensibilidad a la infección.

Las plantas que acabamos de describir, desarrolladas disponiendo de diferentes concentraciones de magnesio, fueron infectadas con la bacteria Erwinia carotovora y transcurridas 24 horas, todas ellas acusaron síntomas de enfermedad, con ablandamiento de tejidos, pérdida de consistencia, y destrucción completa, tal como aparece en la Fig. 65.

Se puede, por consiguiente, aceptar que la presencia de magnesio en grandes concentraciones no altera la sensibilidad de plantas de judía para las alteraciones que ocasionan microorganismos patógenos, como Erwinia carotovora. Cualquiera que sea la concentración de este elemento en el medio, no decide ningún cambio notable en la respuesta de la planta, que sigue siendo la misma que cuando se desarrolla en un medio carente de magnesio.

.../

Fig. 64.- Aspecto de plantas de judía que crecen sobre un medio con cantidades **crecientes** de SO_4Mg . (de izq. a dcha.: 0; 2×10^{-3} ; 4×10^{-3} ; 8×10^{-3} y $15 \times 10^{-3}\text{M}$).

Fig. 65.- Aspecto que presentan las plantas de la figura anterior despues de ser infectadas con Erwinia carotovora,



c. Absorción de potasio, calcio y magnesio.

La concentración de magnesio en el medio no determina un mayor poder de su asimilación por la planta, según queda reflejado en la Fig. 66, aunque sí altera, a determinadas dosis la absorción de otros elementos como potasio y calcio, que varía concretamente para las concentraciones de 2×10^{-3} y $4 \times 10^{-3}M$ de SO_4Mg en el medio.

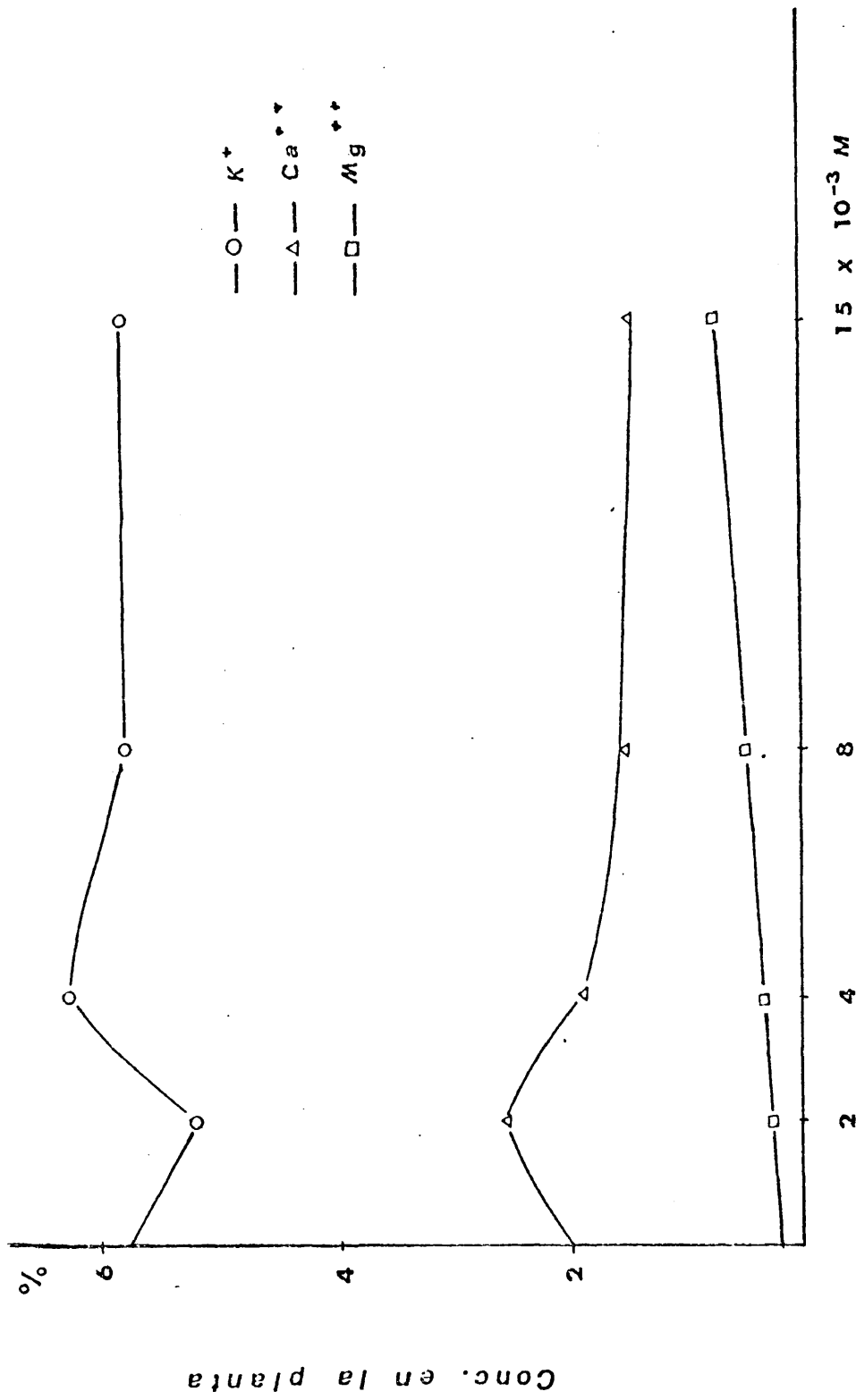
d. Contenido en compuestos orgánicos.

1. Azúcares libres.

Los resultados obtenidos mediante las técnicas de cromatografía nos muestran lactosa, sacarosa, galactosa, glucosa, fructosa y xilosa, como azúcares componentes de los tejidos del vegetal. Así aparece en la Fig. 67, donde las manchas correspondientes a plantas inoculadas (nº 4 - 6) parecen presentar un mayor contenido de azúcares en general respecto al de las no inoculadas, si exceptuamos el caso de la glucosa que aparece con más intensidad en los extractos de plantas sanas (nº 1 - 3).

Puesto que todas las muestras se refieren a igual cantidad, en peso de tejido vegetal, se puede señalar un ligero aumento en los azúcares libres con relación a la concentración de SO_4Mg en el medio de desarrollo de la planta.

.../



$SO_4 Mg$

Fig. 66.- Contenido en potasio, calcio y magnesio en el tejido de Ph. vulgaris L., desarrollada en presencia de concentraciones crecientes de SO_4Mg .

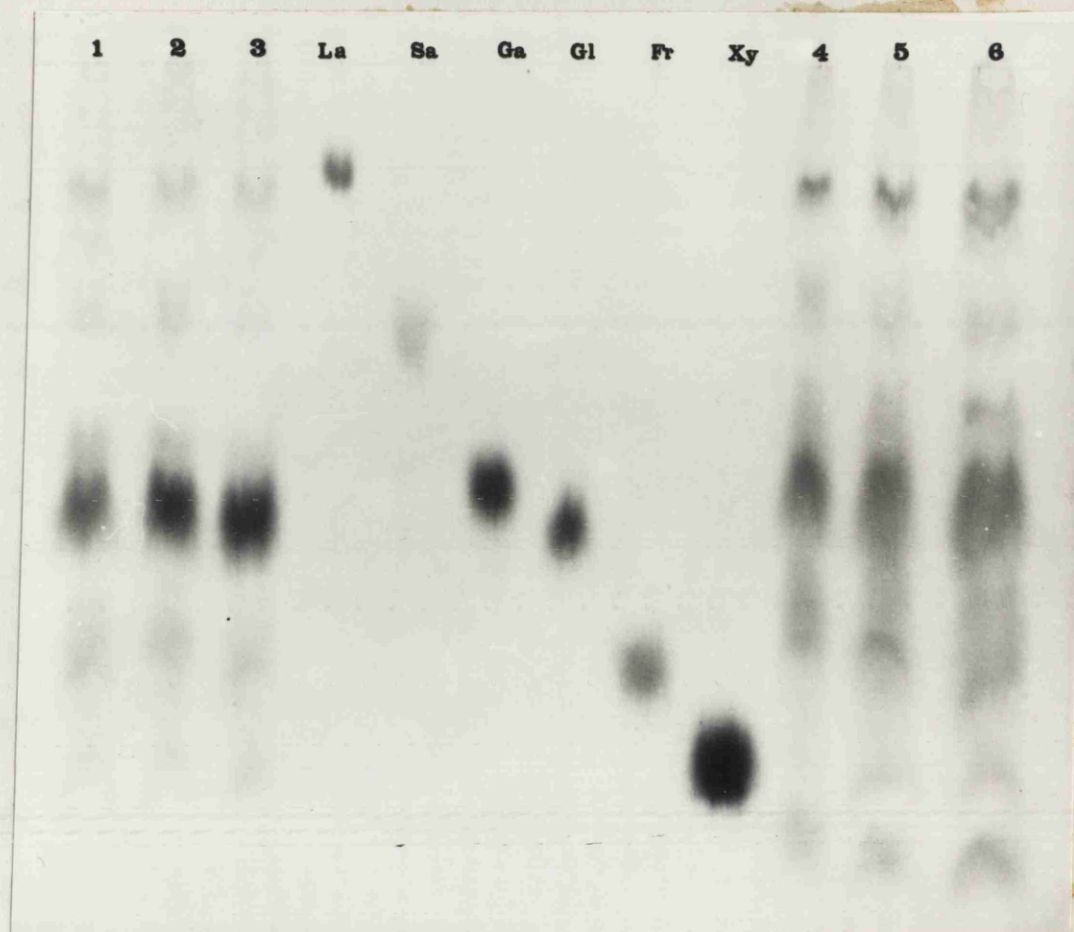


Fig. 67.- Cromatograma de azúcares libres en plantas sanas (1-3) y enfermas (4-6) de judía, que se desarrollan respectivamente en un medio con O_2 4×10^{-3} y $15 \times 10^{-3}M$ de SO_4Mg .

2. Sustancias reductoras.

Las sustancias reductoras contenidas en los tejidos no infectados de Phaseolus vulgaris L. según los resultados obtenidos a partir de los correspondientes análisis realizados, se encuentran representados en la Fig. 68, donde observamos un ligero aumento de dichos compuestos en razón directa al incremento de magnesio en el medio.

Cuando este estudio se efectúa sobre extractos procedentes de plantas inoculadas con Erwinia carotovora, las sustancias reductoras experimentan un descenso hasta la concentración de $4 \times 10^{-3}M$ de magnesio en que inician un suave aumento que llega a su máximo para $15 \times 10^{-3}M$ de SO_4Mg . Estos resultados se reflejan en la Fig. 69.

3. Sustancias pécticas.

El magnesio según los resultados que presenta la Fig. 68, no ejerce influencia patente sobre el nivel de sustancias pécticas en plantas sanas de Ph. vulgaris L., ya que este se mantiene constante a pesar de las distintas concentraciones de dicho elemento en el medio.

Esta falta de acción se puede extender prácticamente a las mismas plantas, una vez inoculadas con Erwinia carotovora, puesto que los resultados que presentamos en la Fig. 69, indican diferencias muy ligeras que no pueden aceptarse como significativas.

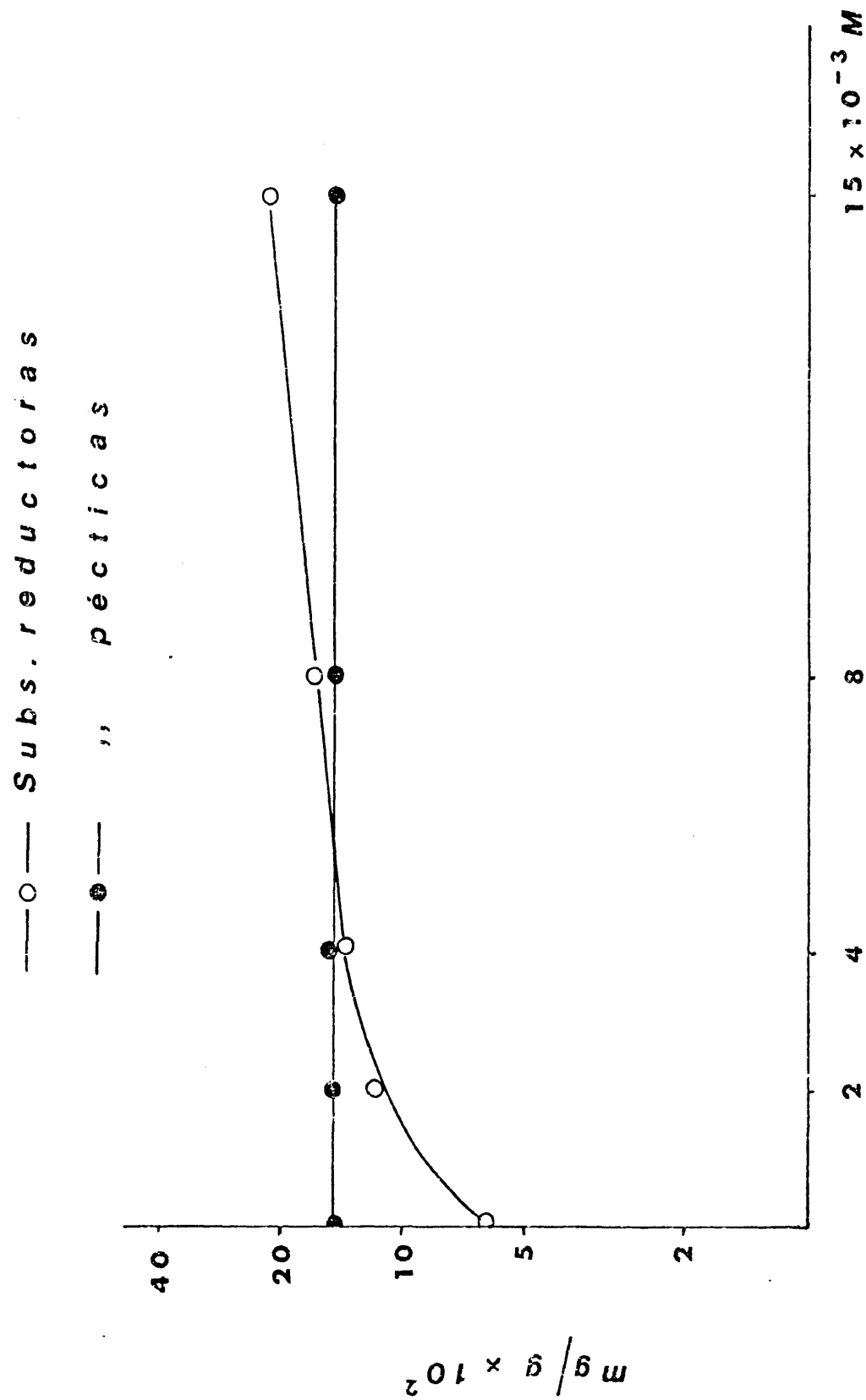
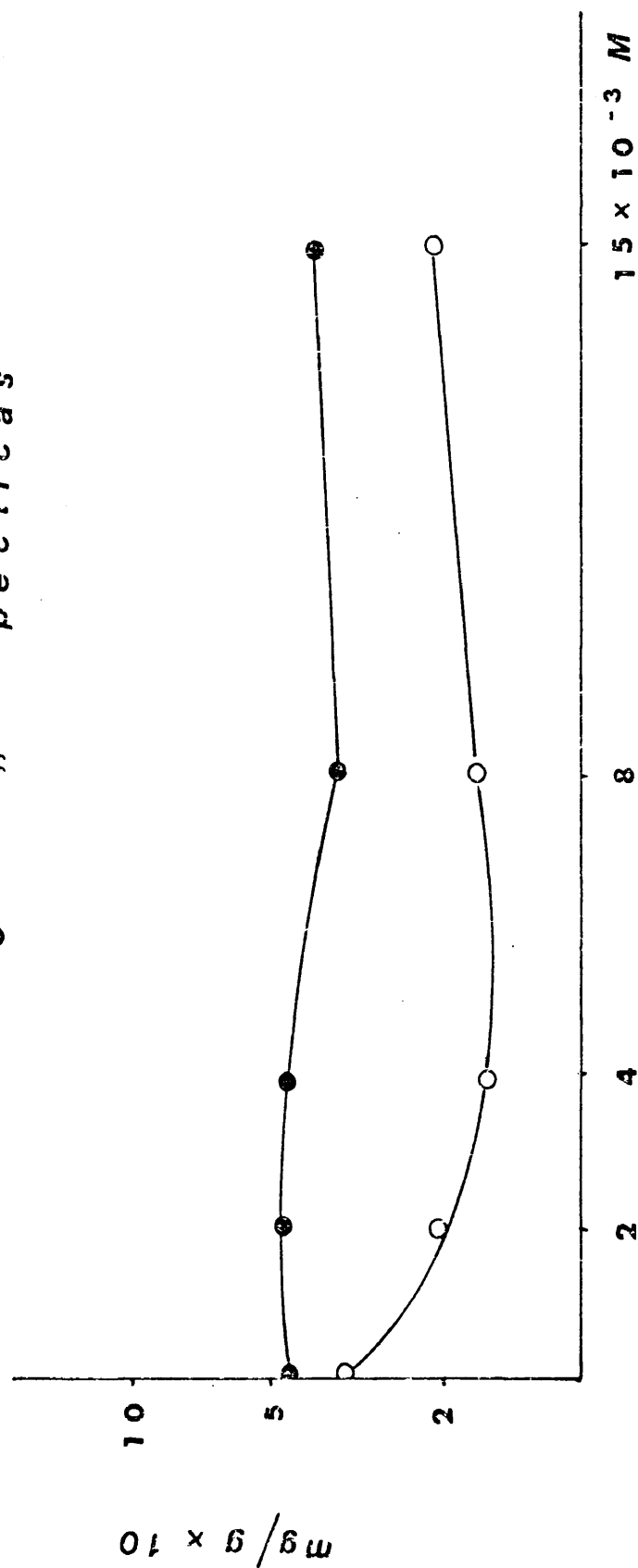


Fig. 68. - Contenido en sustancias reductoras y sustancias pécticas en plantas de judía desarrolladas en medio con cantidades crecientes de $SO_4 Mg$.

—○— Subs. reductoras
 —●— " pécticas



$SO_4 \text{ Mg}$

Fig. 69.- Contenido en sustancias reductoras y sustancias pécticas de judía desarrollada en medio con cantidades crecientes de $SO_4 \text{ Mg}$. e inoculadas con E. carotovora.

4. Aminoácidos libres.

Los resultados obtenidos por cromatografía de papel y capa fina, coinciden en revelar de 12 a 13 aminoácidos en el tejido de plantas de judía sanas y desarrolladas en medios con distintas cantidades de SO_4Mg . Por la Fig. 70 puede apreciarse la escasa diferencia entre las muestras utilizadas sin que se alcance la presencia de detalle necesaria para establecer datos de carácter significativo.

Los análisis obtenidos despues de enfermar la planta aparecen en la figura 71, donde además se acompaña de una serie de testigos para la más fácil identificación de cada uno de los aminoácidos.

Como en casos anteriores, tambien aquí hemos completado el análisis de aminoácidos libres, recurriendo a la técnica cuantitativa del analizador. Las muestras empleadas han sido las correspondientes a tres tratamientos, concretamente al que carece de magnesio y a los que disponen de SO_4Mg en las concentraciones de 4×10^{-3} y $15 \times 10^{-3}\text{M}$. Se han empleado igualmente extractos procedentes de plantas sanas e infectadas con Erwinia carotovora.

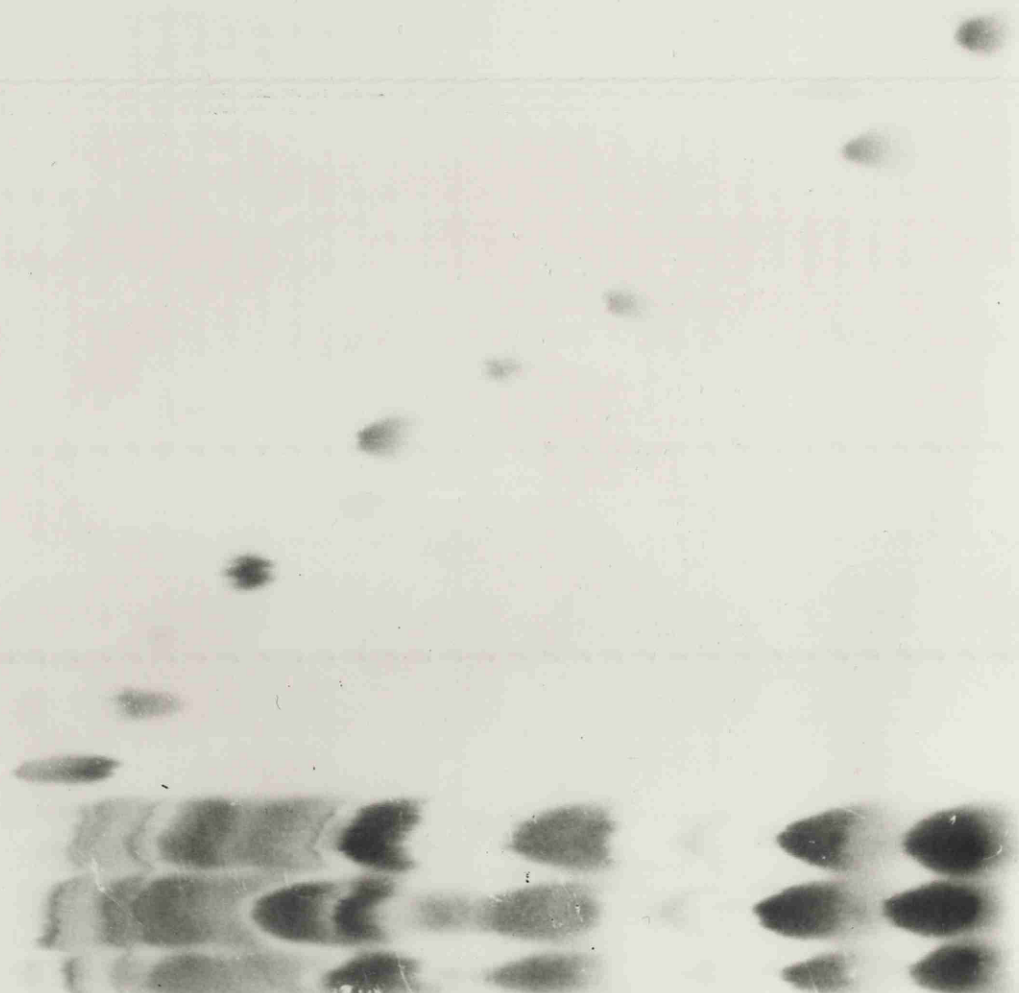
Los resultados de todas estas experiencias aparecen en las Figs. 72 - 77, debiendo señalar que no son directamente comparables entre sí, ya que la cantidad de material inicial empleado en cada ensayo no es idéntico, por haber sido impuesto, según el caso, por la sensibilidad del aparato. Esta es la razón de que presentemos en la Tabla 3

.../

Fig. 70.- Análisis cromatografico de los aminoácidos en judía sana, desarrollada en medios con cantidades crecientes de SO_4Mg .

Fig. 71.- Aminoácidos existentes en tejido enfermo de judía que se desarrolla en medios con 0; 4×10^{-3} y 15×10^{-3} M de SO_4Mg .

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



1 2 3 4 5



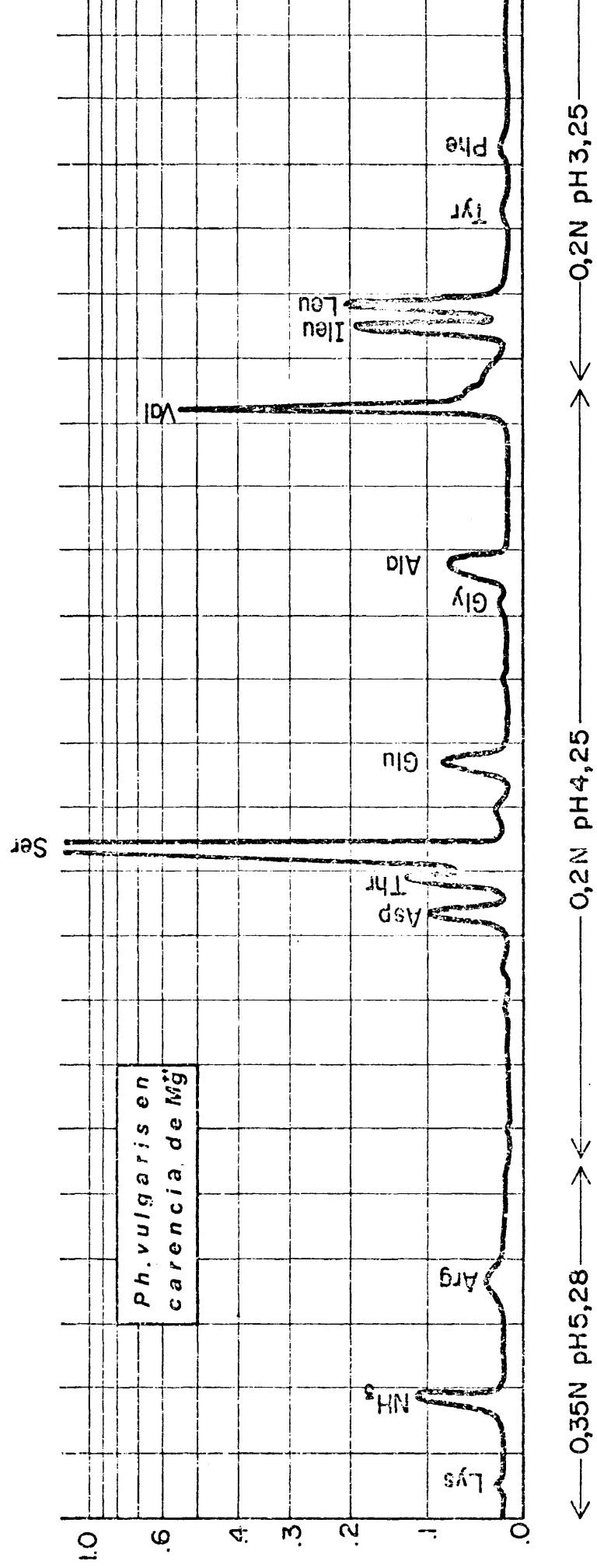


Fig. 72. - Análisis cromatográfico de aminoácidos en *Ph. vulgaris* L. sobre medio carente de magnesio.

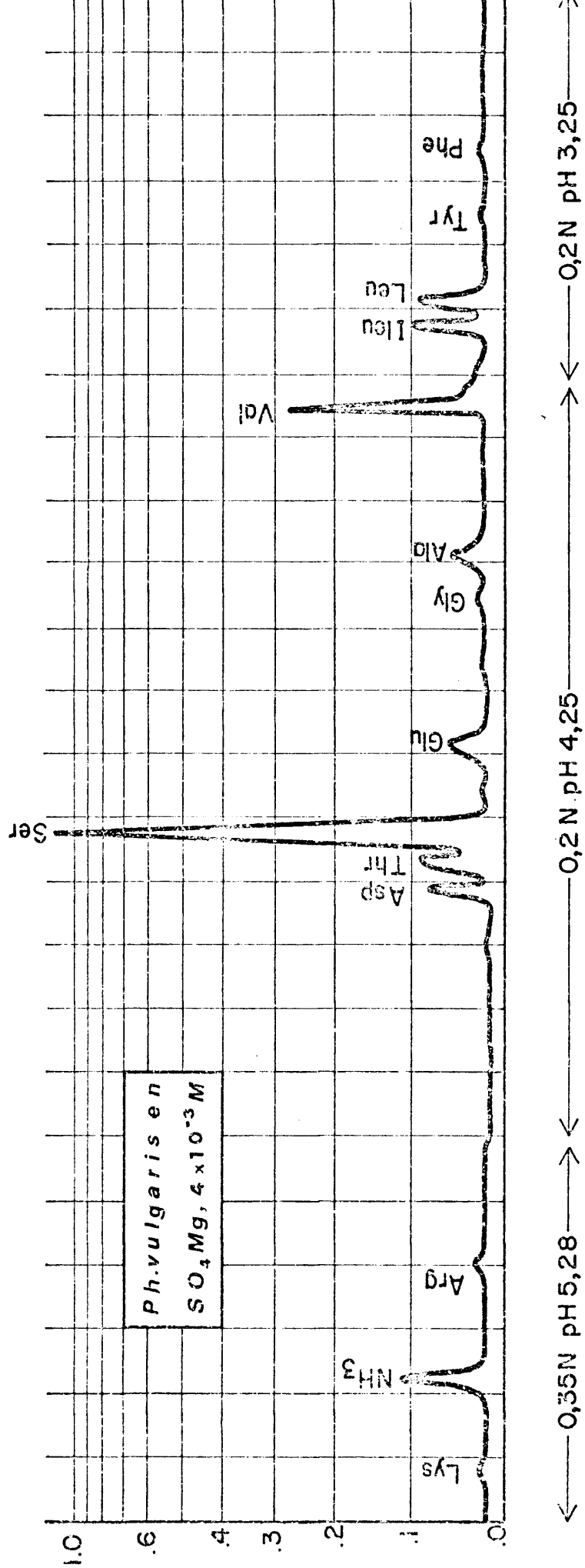


Fig. 73.- Análisis cromatográfico de aminoácidos en *Ph. vulgaris* L. sobre medio con $\text{SO}_4\text{Mg}, 4 \times 10^{-3}\text{M}$.

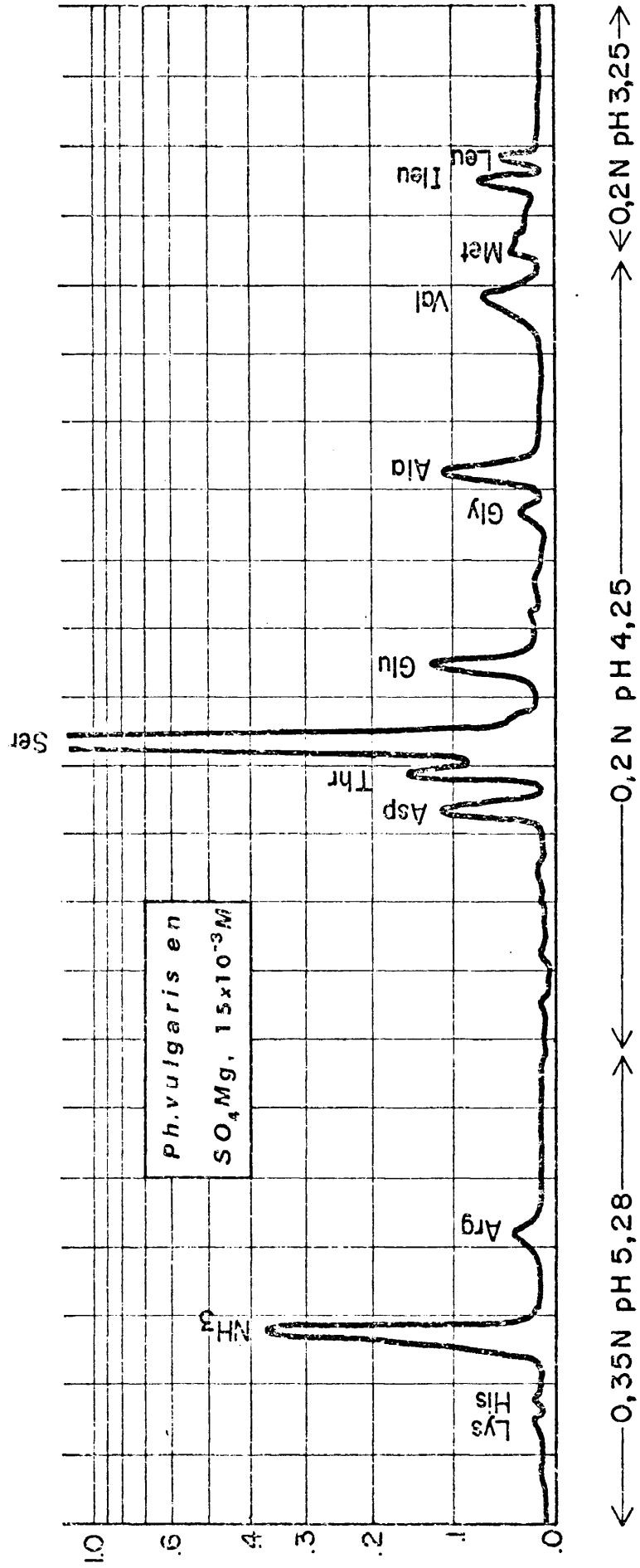


Fig. 74.- Análisis cromatográfico de aminoácidos en *Ph. vulgaris* L. sobre medio con $SO_4Mg, 15 \times 10^{-3}M$.

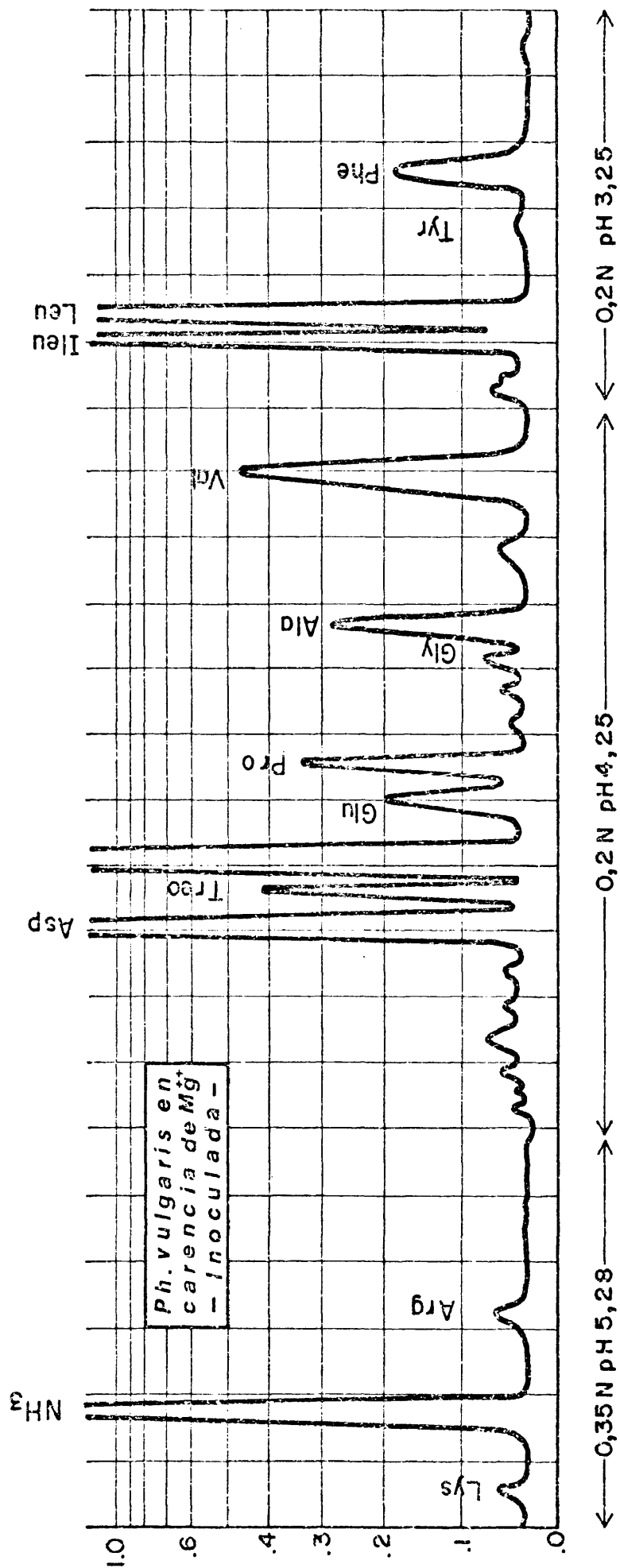


Fig. 75. - Análisis cromatográfico de aminoácidos en Ph. vulgaris L. enferma, sobre medio carente de magnesio.

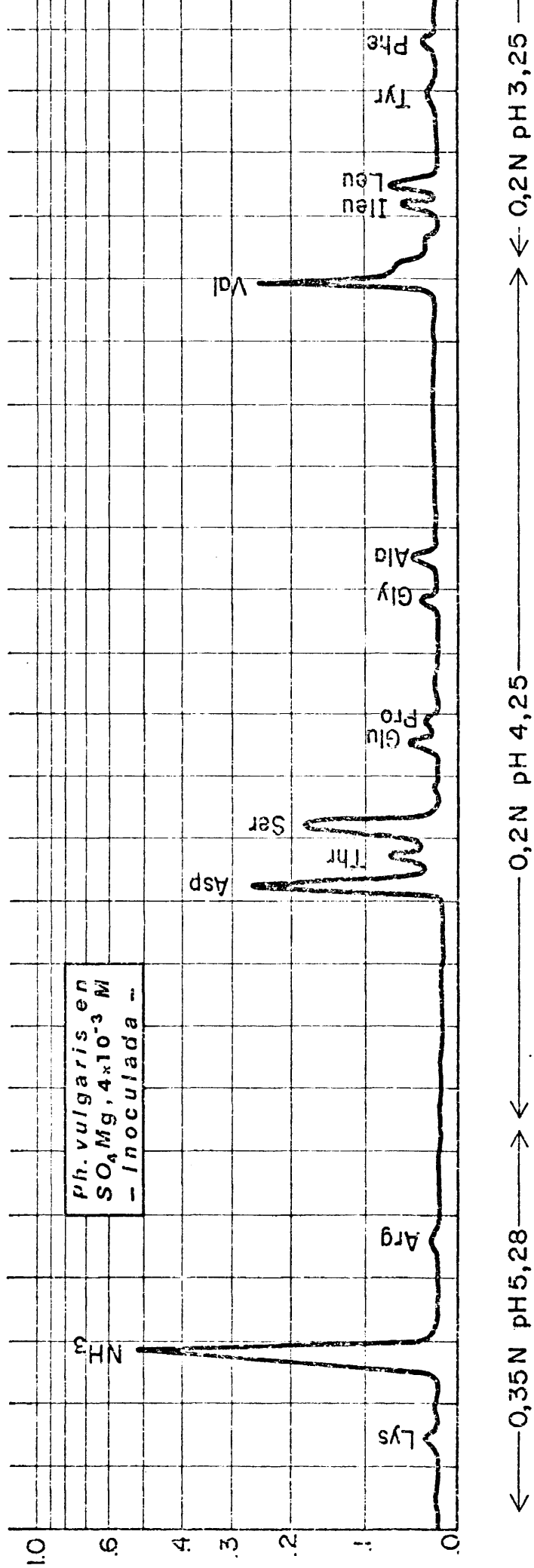


Fig. 76.- Análisis cromatográfico de aminoácidos en Ph. vulgaris L. enferma, sobre medio con $SO_4Mg, 4 \times 10^{-3}M$.

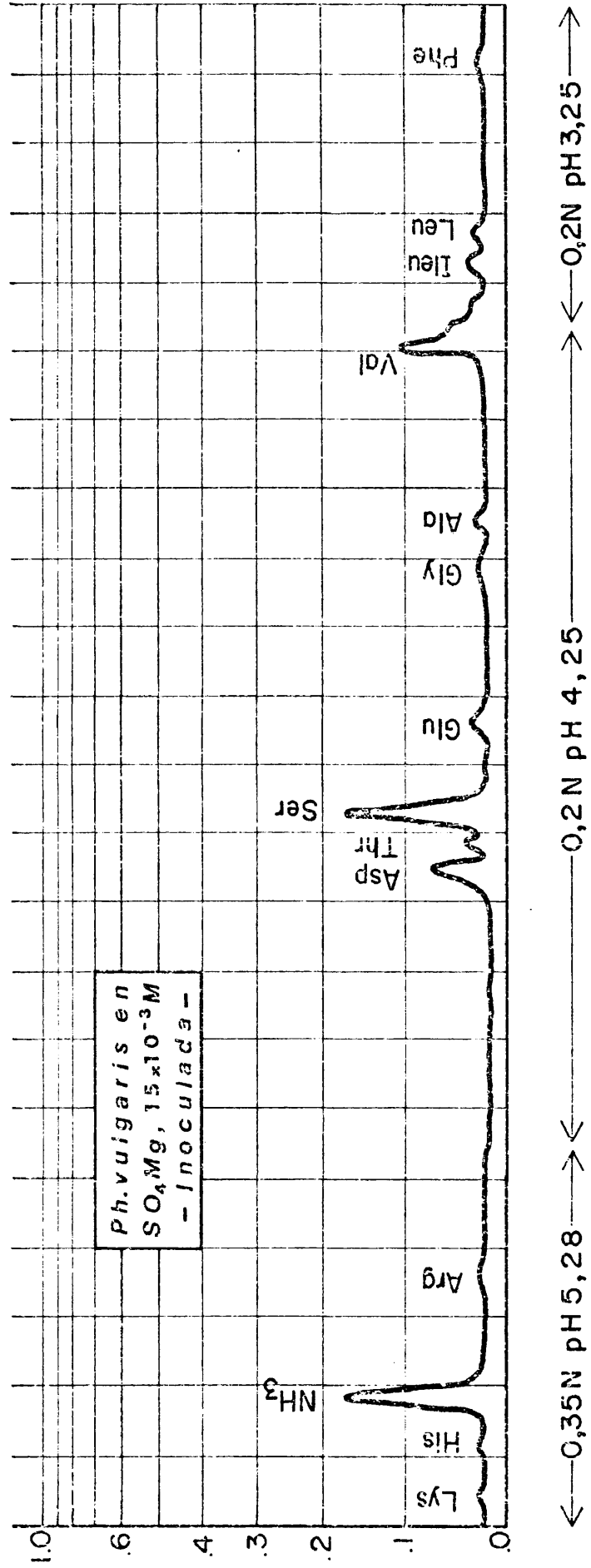


Fig. 77.- Análisis cromatográfico de aminoácidos en *Ph. vulgaris* L. sobre medio con $\text{SO}_4\text{Mg}, 15 \times 10^{-3}\text{M}$.

Tabla nº 3

Aminoácidos existentes en 50 mg. de tejido fresco de Phaseolus vulgaris sano (S) y enfermo (E), cuando se desarrolla en un medio con diferentes concentraciones de $\text{SO}_4 \text{ Mg}$.

	-3		-3			
	S	E	S	E	S	
Lisina	0.0012	0.0196	0.0013	0.0027	0.0057	-
Histidina	-	-	-	-	0.0026	-
NH_3	0.0705	0.8575	0.0698	0.2487	0.2426	0.08031
Arginina	0.0177	0.0549	0.0063	0.0037	0.0289	-
Ac. aspártico	0.0149	0.4923	0.0120	0.0362	0.0399	0.0074
Treonina	0.338	0.2070	0.0203	0.0124	0.0608	0.00334
Serina	0.2094	2.6819	0.1352	0.0355	0.3986	0.0279
Ac. glutámico	0.0204	0.0980	0.0134	0.0090	0.049	0.00393
Prolina	-	0.2217	-	0.0073	-	-
Glicina	0.0030	0.0266	0.0019	0.0036	0.0085	0.00142
Alanina	0.263	0.1398	0.0150	0.0079	0.0498	0.00367
Valina	0.0245	0.3188	0.0149	0.0122	0.0538	0.00475
Isoleucina	0.0387	0.2532	0.0180	0.0096	0.0201	0.0020
Leucina	0.0407	0.3753	0.0169	0.0100	0.0143	0.00192
Tirosina	0.0022	0.0080	-	-	-	-
Fenilalanina	0.0043	0.1216	0.0012	0.0026	-	-

un resumen numérico de la cantidad de aminoácidos analizados en todas las muestras, pero referidos a un peso único de tejido de planta fresca, ya sea sana o enferma.

5. Nitrógeno total.

El nivel de nitrógeno que encontramos en plantas sanas de judía es considerablemente bajo y además no sufre modificación alguna pese al aumento progresivo de concentración de magnesio que se da en el medio (Fig. 78.).

Cuando se trata de plantas enfermas se han observado algunas fluctuaciones en los niveles de nitrógeno, según las disponibilidades de magnesio por el vegetal. No obstante, las diferencias no guardan relación directa con la presencia de magnesio, puesto que los valores más elevados en nitrógeno corresponden a las cantidades máxima y mínima de SO_4Mg en el medio. (Fig. 79).

6. Proteínas.

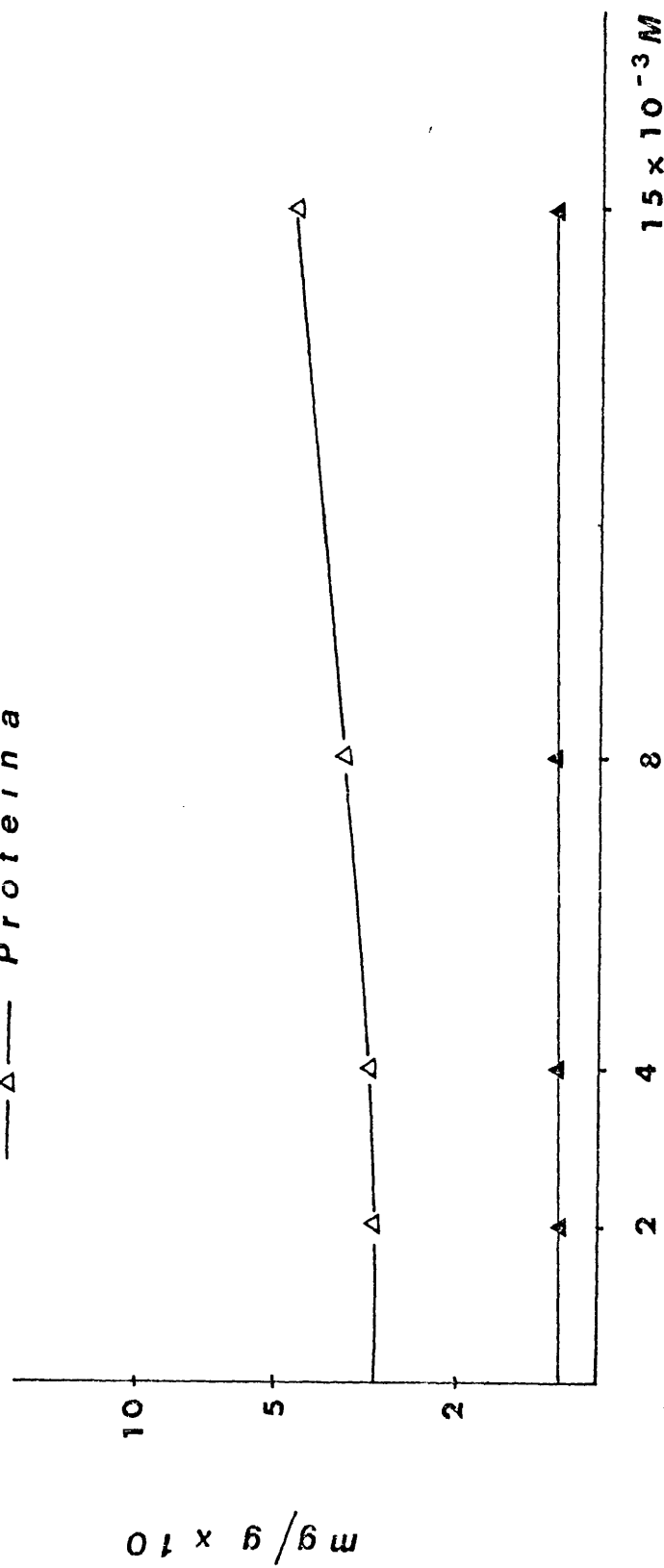
El contenido proteico del vegetal sano no se ve muy alterado por la presencia en mayor o menor abundancia de magnesio en el medio; solo se hace notar una ligera subida para los máximos valores de este elemento, como se refleja en la figura 78.

Cuando se trata de plantas infectadas por Erwinia carotovora, la cantidad de proteína que observamos en sus tejidos enfermos, alcanza

.../

—▲— Nitrogeno

—△— Proteina



SO₄ M g

Fig. 78.- Contenido en nitrógeno y proteína de judía sana, sobre medio con distintas concentraciones de SO₄Mg.

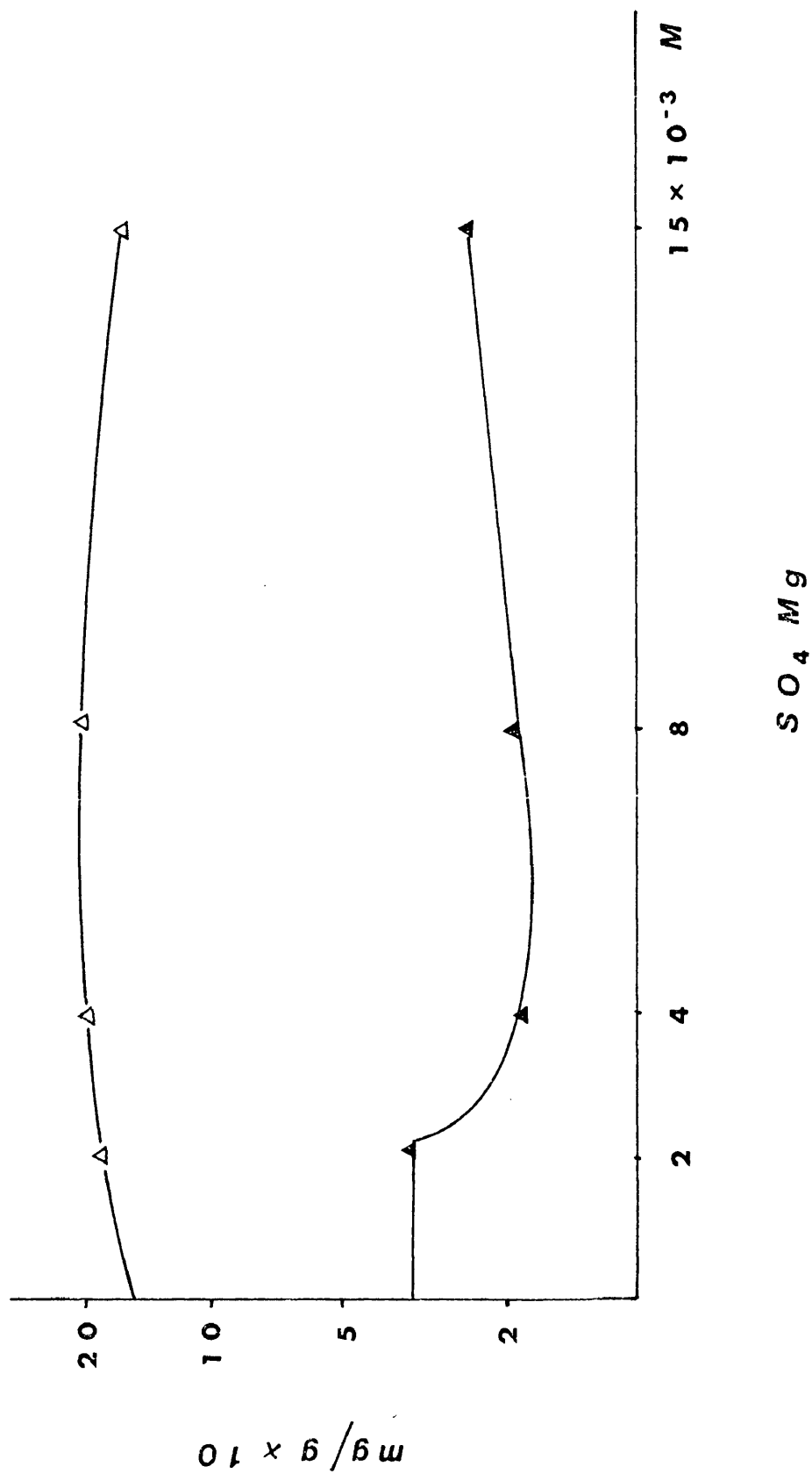


Fig. 79.- Contenido en nitrógeno y proteínas de judía enferma, sobre medio con distintas concentraciones de SO_4Mg .

valores muy superiores a los correspondientes en plantas sanas. Dichos valores, como indicamos en la figura 79, no guardan dependencia alguna con la concentración de magnesio que puede existir en el medio donde se desarrolla la planta.

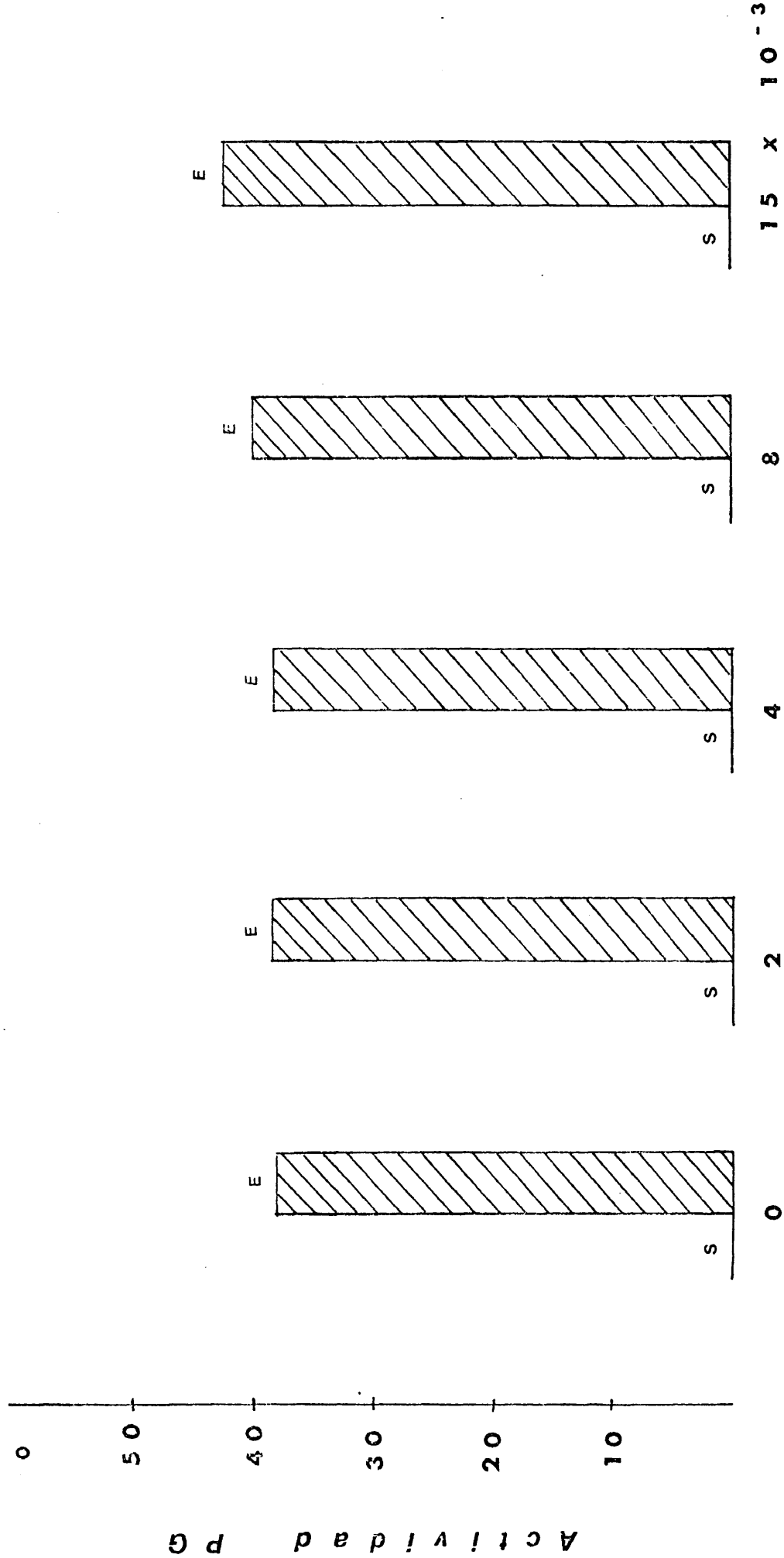
e. Síntesis de enzimas pectolíticas.

1. Las determinaciones de poligalacturonasa en plantas de judía sanas, desarrolladas sobre un medio con distintas concentraciones de magnesio, nos han proporcionado los datos que presentamos en la Fig. 80, y que confirman la ausencia de esta enzima en las condiciones señaladas.

Contrariamente, cuando el tejido enferma la presencia de PG se manifiesta claramente, pero sin oscilaciones inducidas por la disponibilidad en magnesio por la planta.

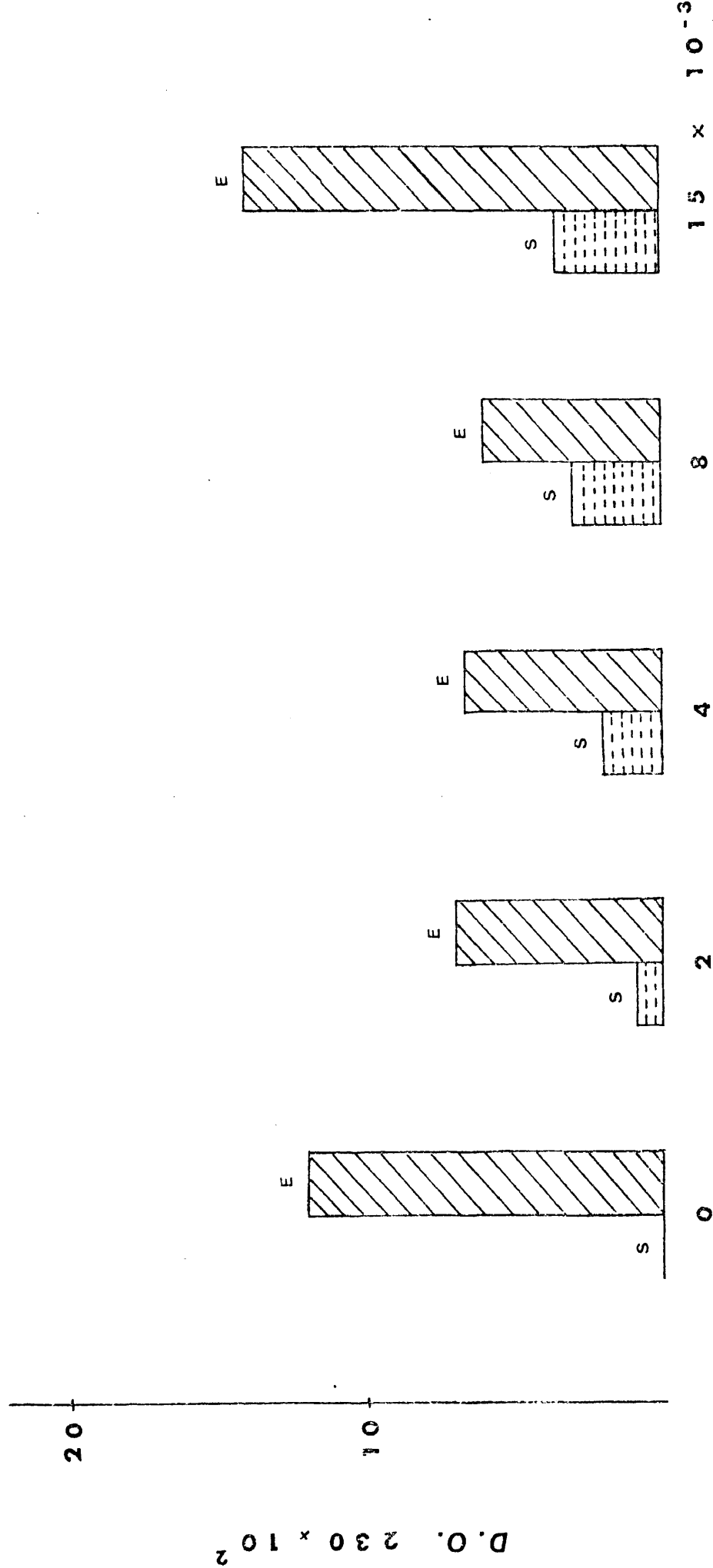
2. La síntesis de PATE en judía desarrollada en medio carente de magnesio es nula, pero a medida que la planta dispone de cantidades crecientes de este elemento, se advierte la presencia de esta enzima, que además lo hace en mayor grado cuanto mayor es la cantidad de magnesio en el medio.

Después de enfermar la planta, el incremento de PATE es notable y puede ser estimulado por determinadas concentraciones de magnesio. (Todo ello es reproducido en la Fig. 81).



Concentración de SO_4 Mg

Fig. 80. - Actividad PG en plantas sanas (s) y enfermas (e) de judía, desarrolladas sobre medio con cantidades crecientes de SO_4 Mg.



Concentración de SO_4 Mg

Fig. 81.- Actividad PATE en plantas sanas (s) y enfermas (e) de judía, desarrolladas sobre medio con cantidades crecientes de SO_4 Mg.

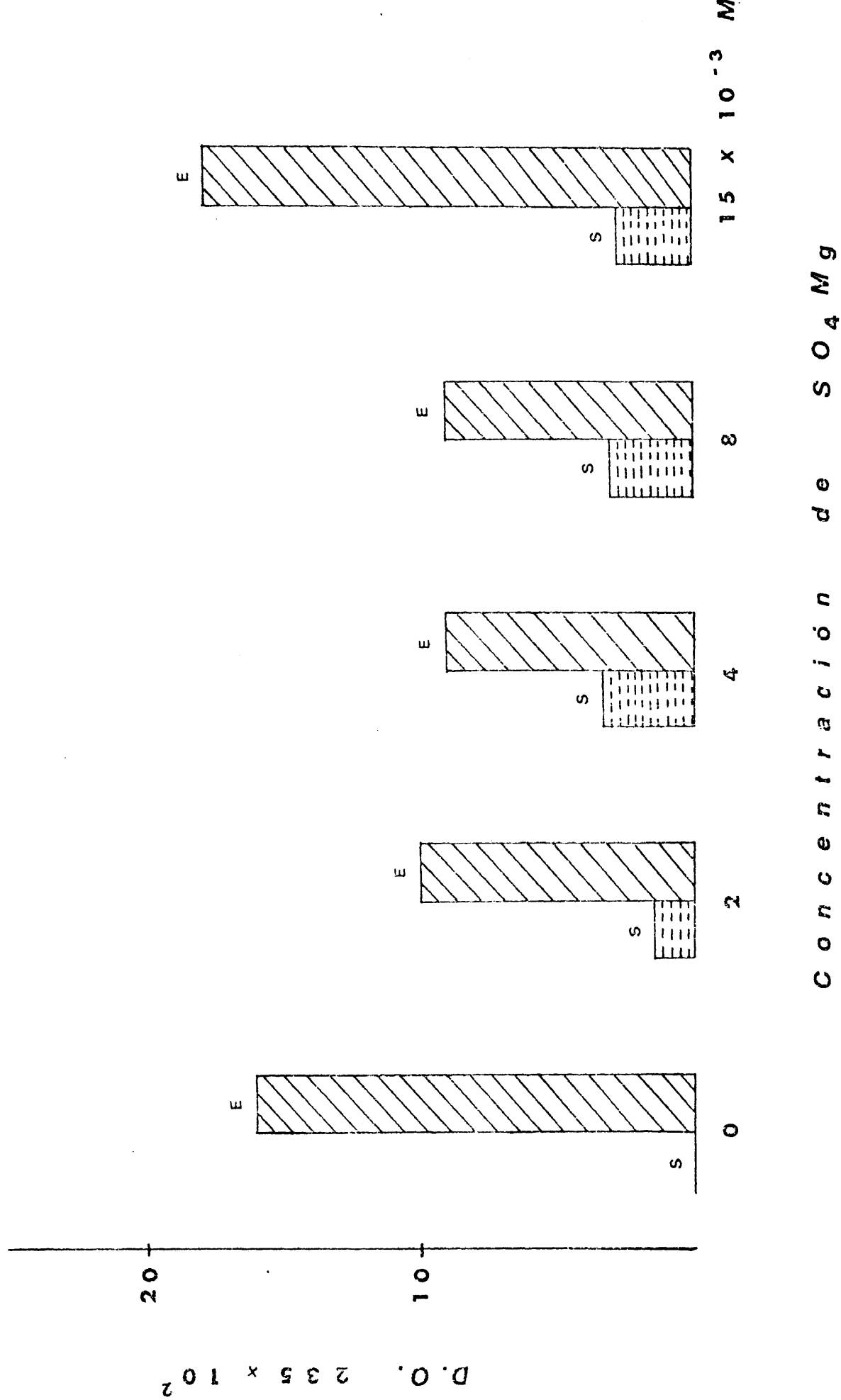


Fig. 82.- Actividad PTE en plantas sanas (s) y enfermas (e) de judía, desarrolladas sobre medio con cantidades crecientes de SO_4Mg .

3. El caso de la otra enzima transeliminativa PTE, guarda gran fidelidad con los resultados que acabamos de reseñar, como puede comprobarse con los datos que aparecen en la Fig. 82, que son muy semejantes a los obtenidos para PATE.

IV . DISCUSSION

IV - DISCUSION

A.- ALTERACIONES EN EL PATOGENO ERWINIA CAROTOVORA, PRODUCIDAS POR LA PRESEN CIA, EN DISTINTOS NIVELES, DE NO_3K , $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ Y SO_4Mg . EN EL MEDIO DE CULTIVO.

La importancia de la nutrición a todos los niveles, tanto con relación al huésped como respecto al patógeno, ha sido reconocida con frecuencia en los casos de interrelaciones entre vegetal y hongos. Podemos citar las experiencias con Rhizoctonia solani y Gossypium hirsutum, debidas a Wenholt et al (146), los trabajos de Moore et al. con Venturia tenuis y Pythium (83) los de Johustone (63) con Venturia inaequalis y manzano, etc. etc.

También, aunque con menos frecuencia, aparecen algunos trabajos que se refieren al interés de la nutrición en el desarrollo de enfermedades ocasionadas por bacterias. Basta recordar las investigaciones de Gallepy y Walker (41), y Matthee y Daines (79) entre otras,

.../

que puntualizan como la susceptibilidad de algunas plantas a determinadas enfermedades puede modificarse introduciendo ciertos cambios en la nutrición.

Por nuestra parte, vamos a ocuparnos, en primer lugar, de las alteraciones que hemos observado en el patógeno bacteriano que constituye el centro de este trabajo: Erwinia carotovora y para ello consideraremos los dos aspectos fundamentales. Estos aspectos se refieren concretamente a sus posibilidades de multiplicación celular, por una parte y, por otra, a la síntesis de enzimas que son capaces de lesionar los constituyentes de la planta.

a. Multiplicación celular.

Respecto al crecimiento de la bacteria en relación al medio de cultivo, hemos de recordar la atención que ha merecido su estudio en distintos laboratorios (116), (126), (136), casi siempre se ha considerado especialmente las fuentes de carbono y nitrógeno, mientras que la influencia ejercida por elementos minerales, por el contrario, no ha merecido gran atención, aparte de los trabajos de Nicholas (91).

Por lo resultados que nosotros hemos señalado, podemos destacar la acción específica del calcio en la evolución de un cultivo de Erwinia carotovora.

.../

Es sin duda, de todos los elementos probados, el que afecta en menor dosis el desarrollo de la bacteria, seguido por el potasio y magnesio. Las alteraciones en el tiempo de generación de la bacteria son explicables por la función específica de cada elemento, que asimismo justifican las anomalías morfológicas.

b. Morfología.

Por los trabajos de Grula (46) conocemos las modificaciones que puede experimentar un microorganismo en su forma, como respuesta a modificaciones en su medio de cultivo. En nuestras experiencias estas modificaciones no son simplemente reflejo de oscilaciones osmóticas, sino que es preciso aceptar una influencia cualitativa que decide la aparición de formas alargadas y esféricas en presencia de 4,6% de NO_3K y 1,25 de NO_3Ca , mientras que cantidades tan elevadas de SO_4Mg como 10% no alteran la morfología propia de Erwinia carotovora. Posiblemente, la acción del potasio se ejerce a nivel de permeabilidad, mientras que siguiendo las sugerencias de Vallee (135) puede interferir en el proceso de división celular. Es cierto que en este proceso interviene también el magnesio, según preconiza Webb (143), pero sin duda lo hace siguiendo otro mecanismo que no es capaz de provocar las alteraciones morfológicas que observamos en los otros elementos.

.../

c. Síntesis enzimática.

Hemos concedido una notable importancia a las alteraciones en la síntesis pectolítica de Erwinia carotovora, producida por los tres elementos que consideramos: potasio, calcio y magnesio.

Aunque las enzimas pécticas, en general, han sido descritas indistintamente de origen constitutivo o debidas a un proceso de adaptación, en el caso de la bacteria que estudiaremos se ha probado repetidas veces en nuestro laboratorio, (127) (129) que precisa para su formación de un sustrato específico de naturaleza péctica.

Esta característica es indiscutiblemente de gran valor cuando se quiere interpretar la aparición de enfermedades vegetales dependiendo de la edad de la planta, condiciones de desarrollo, etc. etc.

Tuttobello y Mill (131) en sus estudios con Aspergillus niger conceden a la composición del medio un efecto decisivo sobre la naturaleza y cantidad de enzimas pécticas sintetizadas. De forma análoga se manifiestan también Zucker (153) y otros.

Por las razones apuntadas, hemos elegido para este estudio un medio en el que Erwinia carotovora puede sintetizar las enzimas degradativas PG, PATE y PTE, ya que estas enzimas constituyen indudablemente uno de los principales factores relacionados con la patogenesis.

1. Poligalacturonasa.

Nuestros resultados nos proporcionan datos de indudable interés que permiten establecer diferencias entre las tres enzimas señaladas. Así, hemos de admitir que la enzima PG es inhibida en presencia de cualquiera de las sales NO_3K , $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ y SO_4Mg , si bien la inhibición guarda relación con cada compuesto. Ayers et al (6) y Turner y Bateman (132) además de otros investigadores, han confirmado en sus experiencias que la presencia de calcio decide la inhibición de la enzima PG en muy diversos microorganismos. El mecanismo por el cual se manifiesta esta inhibición no ha sido aclarado aunque tal vez esté relacionado con el papel de cofactor que Stadtman (113) atribuye al calcio en las reacciones enzimáticas.

Respecto al magnesio, hemos de puntualizar que la acción inhibidora que observamos es muy inferior a la que produce el calcio, pero se aproxima bastante a las conclusiones expuestas por Starr y Chatterjee (119).

El papel del potasio en la síntesis de PG, en nuestro caso se presenta, para ciertas concentraciones claramente inhibidor, lo que es sin duda admisible, ya que según Miller (81) su efecto sobre una misma enzima puede manifestarse de muy diferentes formas,

.../

en dependencia de varios factores entre los que es fundamental el microorganismo específico que sintetice la enzima.

2. Pectatotranseliminasa.

También la enzima PATE es de naturaleza inducible y en condiciones normales la bacteria Erwinia carotovora la sintetiza, sin que la presencia de 3% de NO_3K en el medio afecte su síntesis. Es ésta, de todas las sales ensayadas, la que menos interfiere con la producción de PATE. Los otros compuestos, $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ y SO_4Mg anulan dicha síntesis a concentraciones de 1,5 y 3% respectivamente. Si admitimos la indicación de Starr y Chatterjee (119) de que existe una correlación positiva entre la virulencia de Erwinia carotovora y la producción de PATE, tendremos igualmente que reconocer el interés de estos compuestos en la patogenesis bacteriana.

Por otra parte, el calcio y con menor especificidad el magnesio, son elementos precisos para que las enzimas transeliminativas puedan manifestar su acción. Ayers et al (6), así como Starr y Moran (118), y otros investigadores, señalan la concentración de $5 \times 10^{-4}\text{M}$ como el límite de efectividad positiva para calcio y, por encima de este límite, su efecto es, por el contrario, inhibitorio.

.../

La acción del magnesio no solo depende de su concentración sino también de la procedencia de PATE, lo que da lugar a aparentes contradicciones que hablan de la inhibición de esta enzima cuando es producida por Rhizoctonia solani (10), mientras que si procede de Fusarium sp. experimenta un claro estímulo por la presencia de magnesio (81).

3. Pectintranseliminasa.

En el caso de la otra enzima transeliminativa, pectin transeliminasa (PTE) debemos destacar la acción inhibidora ejercida por concentraciones bajas de NO_3K , y su desaparición a medida que estas van elevándose hasta llegar incluso a ser ligeramente estimulante, en la síntesis de PTE por Erwinia carotovora, a partir de 3,5%.

El mecanismo que decide la aparición de estos resultados no ha podido aclararse, por lo que no creemos oportuno sugerir ninguna de las posibles teorías pendientes de comprobación.

La intervención en la síntesis de PTE por parte de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ y SO_4Mg tiene bastante semejanza con cuanto queda señalado acerca de su influencia sobre la enzima PATE, especialmente en el primero de los casos.

.../

También aquí ha sido considerado el efecto de estos elementos sobre la actividad enzimática, y en todo ello, nos identificamos con lo señalado por Edstrom y Phaff (36) en su estudio con Aspergillus fonsecaeus, si bien hay que distinguir entre las concentraciones usadas por nosotros y las que citan estos autores.

Todas las consideraciones expuestas hasta ahora nos permiten aceptar, como una de las bases de la virulencia bacteriana, una serie de condiciones impuestas por los factores que concurren en el lugar donde la bacteria está localizada.

El efecto de los factores nutritivos puede manifestarse en alteraciones de la división celular que conducen a formas alargadas y globosas perfectamente caracterizadas y que en los escasos ensayos practicados, se manifiestan inocuas frente al posible huésped. Pero estos mismos factores nutritivos influyen también en la producción enzimática y crecimiento celular.

Estas observaciones nos permiten suponer que si la bacteria que estudiamos ha experimentado "in vitro" las alteraciones que comentamos, puede también experimentar alteraciones análogas por acción de los constituyentes del tejido huésped. En tal caso, había que concluir junto a Pérombelon (98) que la

.../

virulencia de Erwinia carotovora puede no ser necesariamente una característica intrínseca, sino una propiedad condicionada por los factores que concurren en el lugar en que puede desarrollarse.

Tras estas sugerencias, hay que admitir que una planta huésped representa un sustrato de una determinada composición química pero, al mismo tiempo, sigue siendo un organismo vivo y, por tanto, es capaz de responder al ataque del microorganismo patógeno y de utilizar los factores a su alcance para su propio beneficio.

En el siguiente apartado tratamos de las reacciones de la planta huésped, en relación a sus posibilidades nutritivas.

B. RESPUESTA DE PHASEOLUS VULGARIS EN RELACION A MODIFICACIONES EN SU MEDIO DE CRECIMIENTO. INFLUENCIA DEL NO_3K .

La influencia de las características del suelo en el rendimiento y mejora de cosechas es uno de los hechos de mayor divulgación y aceptado por todo el sector agrícola. Esta influencia se acusa no solamente en la evolución de la planta sino también en su susceptibilidad a determinadas infecciones.

Vamos a considerar en primer lugar las características que presentan las plantas de Phaseolus vulgaris en dependencia con la cantidad de potasio en el medio.

.../

La cantidad de potasio que se pone a disposición de la planta es la única variación que se da en el medio, ya que los demás elementos, especialmente nitrógeno y fósforo, se mantienen dentro de los límites de equilibrio. Este equilibrio no se rompe, pese a aumentar el NO_3K hasta $1,5 \times 10^{-2}\text{M}$ y el crecimiento de las plantas no acusa, en su aspecto externo, ninguna variación.

Esta observación parece indicar que la exigencia de la planta por el potasio no alcanza niveles elevados, ya que en el ensayo en que se ha prescindido de este elemento, basta la existencia, en forma de trasas, en que acompaña a los otros componentes, para satisfacer las necesidades del vegetal.

a. Sensibilidad a la infección por
Erwinia carotovora.

Las plantas crecidas como queda indicado, se infectan con Erwinia carotovora empleando concentraciones de inóculo superiores a 10^6 para garantizar la difusión del parásito, y los resultados obtenidos sí revelan modificaciones en la fisiología del vegetal, a las que consideramos responsables de la distinta resistencia que presentan las plantas de judía.

Podemos hablar de una resistencia a la infección cuando la concentración de potasio en el medio es alta; esta observación coincide

.../

con lo expuesto por Nayudu y Walker (89) tras sus estudios con Xanthomonas vesicatoria y plantas de tomate, en los que consiguen disminuir el índice de enfermedad más de un 50% con solo aumentar el nivel de potasio en el medio. También Parker et al. (93) llegan a conclusiones análogas en sus estudios sobre fire blight. Nosotros podemos fijar la concentración de $8 \times 10^{-3} \text{M}$ de NO_3K en el medio de desarrollo de judía, como el valor límite de potasio capaz de provocar una resistencia a la infección de Erwinia carotovora.

Ahora bien, el proceso que desencadena esta resistencia no está exclusivamente vinculado a la presencia del potasio, ni a su intervención directa en determinados pasos metabólicos, sino que son causa importante también toda una serie de interacciones en las que interviene el potasio de forma más o menos directa.

Estas interacciones pueden dar lugar a cambios de importancia en el huésped, que lo transforma en un medio, que por ser menos adecuado para el patógeno, decide su resistencia en el momento de la infección.

Por estas razones, creemos de interés considerar la composición química de las plantas sometidas a una nutrición con dife

.../

rentes concentraciones de potasio, antes y despues de surgir el ataque de Erwinia carotovora.

En primer lugar, pasamos a considerar las condiciones en que tiene lugar la absorción de los principales elementos del medio.

b. Absorción de potasio, calcio y magnesio.

La mayor dotación de potasio en el medio de desarrollo no supone un aumento proporcional en su contenido dentro del tejido vegetal, puesto que según hemos podido comprobar, la concentración de este elemento en plantas de Phaseolus vulgaris apenas experimenta variación para concentraciones en el medio superiores a $4 \times 10^{-3}M$, las únicas variaciones se dan para incrementos hasta este valor.

Lo que ofrece duda es que el exceso de potasio en el medio condiciona una menor absorción de calcio, lo que indudablemente ha de conducir a que la relación K/Ca en el interior del tejido aumente, y si admitimos las conclusiones de Lagerwerff y Eagle (72) se producirá un aumento de permeabilidad con las alteraciones consiguientes en la presión osmótica de la savia.

.../

En contraste con estas observaciones, la influencia del potasio sobre la absorción de magnesio podemos considerar que no existe en los límites de concentraciones que hemos establecido, lo que nos obliga a referirnos a los trabajos de Kabu y Toop (66) que indican que el efecto antagonista entre estos elementos se produce cuando las concentraciones de ambos son muy elevadas. Posiblemente el no observar este antagonismo se deba a que la concentración de magnesio que empleamos no llega a los límites altos requeridos.

c. Contenido en compuestos carbonados.

Entre todos los componentes vegetales son, sin duda alguna, los de naturaleza carbonada los más estudiados por su relación con la propagación de microorganismos fitopatógenos. Las investigaciones de Grainger (45) en este aspecto han llegado incluso a decidir la posibilidad a enfermar una planta de acuerdo con el metabolismo de sus carbohidratos.

Eaton (35) entre otros autores, concluye que el contenido de carbohidratos en el vegetal aumenta al incrementarse el nivel de potasio en sus tejidos, conclusión que coincide con los resultados que nosotros presentamos.

Si hemos de atender a las sugerencias de Albersheim (2) existe una movilización de este tipo de compuestos hacia el punto en que el patógeno intenta penetrar en el huésped y su acumulación en este punto puede incidir en la relación huésped-parásito.

La utilización de los compuestos carbonados por el parásito es un hecho claro que se hace patente por la pérdida de carbohidratos totales que experimenta el tejido vegetal al transformarse de sano en enfermo. Los datos aportados en este estudio encuentran clara evidencia de la alteración que experimenta el metabolismo de estos compuestos no ya de acuerdo con la dotación en potasio del medio, sino con el estado de vigor de la planta, como reflejo de su infección por Erwinia carotovora.

Sabemos por otras experiencias (128) la influencia que distintos azúcares ejercen en el desarrollo de Erwinia carotovora, tanto en el aspecto cualitativo como cuantitativo y que este efecto puede ser estimulante o inhibidor sobre las actividades enzimáticas de la bacteria.

La respuesta de cada microorganismo fitopatógeno ante la concentración de carbohidratos en su huésped respectivo puede variar entre límites bastante amplios dependiendo no solo del habitat

.../

vegetal sino muy directamente de la densidad de inóculo (129)

lo que, en parte justifica la aparición de resultados contradictorios al no controlar en cada experiencia los factores de influencia más decisiva.

En nuestro caso, la influencia del potasio en el medio también puede relacionarse con la cantidad de azúcares libres que contiene el tejido de judía, habiendo observado que el aumento en la concentración de NO_3K en el medio en que la planta se desarrolla, no decide un aumento proporcional en los azúcares libres de sus tejidos. Estos azúcares son utilizados por Erwinia carotovora inmediatamente de establecer contacto con la planta y cuando esta enferma, dejan de ser detectados en sus tejidos. La sensibilidad de los métodos de análisis no nos permite establecer preferencias en la utilización de dichas azúcares por la bacteria, ya que todos ellos desaparecen simultáneamente, tanto lactosa y sacarosa como glucosa, levulosa y xilosa.

Hasta que punto la presencia de sustancias carbonadas en el vegetal puede intervenir en su resistencia a infecciones microbianas, es algo que no podemos deducir en el caso que estudiamos, ya que el proceso de represión catabólica sobre actividades enzimáticas, no es el único factor que puede decidir una respuesta específica, aunque su influencia haya sido admitida por varios autores.

.../

Hemos de mencionar que el material péctico que analizamos en los tejidos del huesped se mantiene practicamente dentro de la misma proporción, con independencia de la riqueza en potasio del medio de nutrición de la planta, por tanto su inducción en los procesos de patogénesis no creemos que sea destacable.

d. Contenido en compuestos nitrogenados.

Entre las implicaciones ecológicas de la nutrición vegetal es indudable la importancia que adquiere la movilización de los compuestos nitrogenados dentro de los tejidos vegetales.

La existencia de una relación entre K y N, en el metabolismo de la planta es un hecho conocido y probado en muy variadas circunstancias y por distintos autores, basta recordar las experiencias de Beeson (12) y Easwaran (34) entre otros. La relación inversa entre los diferentes niveles de K y N aparece tambien en nuestras experiencias con judia que acusan una disminución, aunque lenta, del nitrógeno total a medida que aumenta el NO_3K en el medio.

Pese a ello el contenido en proteína aumenta ligeramente en el tejido de judia a la vez que lo hace el potasio del medio. Esta observación puede ser justificada teniendo en cuenta las sugerencias de Nguyen et al (90) acerca de la intervención del potasio en la

.../

incorporación de aminoácidos necesaria para que se efectue la síntesis proteica.

Como consecuencia del ataque bacteriano a plantas de Phaseolus vulgaris se produce un notable aumento en sus tejidos a partir de plantas que no han establecido contacto con el patógeno Erwinia carotovora. Este aumento, logicamente, ha de atribuirse a interacciones de huésped/patógeno además de las concentraciones de potasio en el medio. Las determinaciones de proteína en estas mismas plantas dan valores algo superiores a los observados en las plantas sin tratar, lo que parece razonable, según las indicaciones de Heitefuss et al (50). que atribuye este aumento a un mecanismo de defensa del vegetal que en el caso que consideramos solo llega a ser eficaz en las ocasiones en que la presencia de potasio alcanza los límites más altos.

Aunque la interpretación no resulta muy clara, creemos oportuno recordar las sugerencias de Naik y Powell (87), así como de Staples y Stahmann (115) que señalan la aparición de proteínas nuevas en el tejido vegetal, como consecuencia del ataque de microorganismo fitopatógenos. Por su parte, Uritani (134)

.../

apunta que la infección puede producir, en su primera fase, una síntesis rápida de proteína que puede ser seguida por una degradación gradual con liberación de algunos aminoácidos. A la vista de todas estas ideas, hemos también de admitir que el aumento de proteínas que observamos en las plantas infectadas no solo está relacionado con la nutrición exógena del vegetal sino además con el sistema defensivo que desarrolla en los casos de infecciones.

Sin llegar a hidrolisar la proteína vegetal, hemos presentado un análisis de los aminoácidos libres habiendo observado que aparecen los mismos en todas las plantas, sanas o inoculadas, independientemente del tratamiento con NO_3K a que se han expuesto. Las únicas diferencias apreciadas han sido de tipo cuantitativo; así podemos señalar que al aumentar el potasio en el medio donde crecen las plantas de judía, aumentan en sus tejidos aminoácidos como valina, ácido glutámico, treonina, ácido aspártico, a la vez que se observa disminución en otros como serina, arginina o isoleucina. Semejantes incrementos se observan también en las mismas plantas aunque enfermen, si bien en este caso las pérdidas cuantitativas son más escasas.

.../

Aunque no de una forma definitiva, sí podemos relacionar las alteraciones en aminoácidos libres dentro del tejido vegetal, con la presencia de potasio en el medio, dada la intervención que este elemento tiene en la incorporación de aminoácidos libres en la síntesis proteica, según señala Webster (144). Pero también es cierto que en las plantas infectadas, el microorganismo patógeno interviene en la movilización de los aminoácidos libres y participa en una serie de alteraciones de muy difícil interpretación, ya que recogiendo las sugerencias de Kaminska (67) no puede señalarse si tales alteraciones son el resultado o la causa del proceso patológico .

Queremos resaltar los datos que corresponden al aminoácido arginina, ya que su presencia es manifiesta en el tejido sano aunque en distinta cantidad en relación con el potasio del medio. Cuando la planta presenta síntomas de enfermedad, su contenido en arginina disminuye y llega a desaparecer por completo en el tejido dañado. Patel y Walker (94) estudiando el halo brillante en judía observaron también una disminución de arginina en las plantas inoculadas.

Uno de los aminoácidos que más se ha relacionado con la patogénesis vegetal es la prolina que en las plantas sanas

que cultivamos no aparece cuando la concentración de potasio en el medio es inferior a $8 \times 10^{-3}M$, en lo que coinciden nuestros resultados con lo señalado por Tso y Mc Murtrey (130) para plantas de tabaco. Asimismo creemos de interés puntualizar que es uno de los aminoácidos cuya disminución o desaparición en el tejido infectado es bien manifiesto.

También es notable el bajo contenido en valina que observamos en plantas que crecen en presencia de los valores más bajos de potasio, lo que nos sugiere relacionar ambos factores como indican Freiberg y Steward (39).

En cuanto a los ácidos aspártico y glutámico podemos referirnos a una pérdida de su contenido en la planta a medida que sube el nivel de potasio en el suelo. Si esta oscilación se debe o no a compensaciones entre aminoácidos como indican Richards y Berner (102) no lo hemos podido confirmar con los medios a nuestro alcance.

e. Presencia de enzimas pécticas.

Los análisis realizados para determinar la actividad de PG en las plantas de judía sanas, dieron resultados negativos que coinciden con las experiencias de Hancock and Millar

.../

(48). Sin embargo, cuando la planta es infectada por Erwinia carotovora su riqueza en PG es notoria pudiendo establecerse una proporción directa entre actividad PG y el grado de infección del vegetal.

Si consideramos las enzimas transeliminativas, comprobamos que tanto PATE como PTE, aparecen en plantas sanas y enfermas sin que se revele ninguna dependencia respecto a las distintas concentraciones de potasio en el medio. Así como la actividad PATE es baja en todos los casos y muy semejante en tejidos sanos y enfermos, la determinación de PTE, nos da valores practicamente dobles en las plantas enfermas respecto a las sanas. Esto nos podría llevar a señalar esta enzima como una de las más responsables del proceso patológico que nos ocupa, lo cual estaría de acuerdo con las experiencias de Dean y Wood (29) y Byrde y Fielding (21). Sin embargo, tambien hay quien asegura que el papel más importante en la iniciación de la enfermedad se le debe atribuir a PG mientras que PATE y PTE intervendrían simplemente en el progreso y extensión de la misma (133).

No hay que olvidar que la acción de estas enzimas en el interior de la planta puede ser distinta a la que desarrollarían in vivo,

.../

ya que algunos de los componentes en el medio vegetal ejercen diversos efectos, estimulantes o atenuantes, sobre ellas. En este sentido Jones et al. (65) dicen que 100 ug. de proteína de tallo de tomate son suficientes para producir un 50% de inhibición de la actividad PG en Fusarium oxysporum, de forma similar a lo ya indicado por Albersheim y Anderson (3).

También se ha demostrado como diversos azúcares pueden actuar en distintos sentidos sobre la acción de estas enzimas, así como otros diversos productos metabólicos (14) (95) (112).

En nuestro caso, la conjunción de estos factores viene, sin duda, a modificar la acción que el potasio ejerce en las enzimas pépticas sintetizadas por Erwinia carotovora y también sobre el crecimiento y desarrollo del patógeno en el interior del huésped, que no es ninguna forma proporcional a su secreción enzimática.

Como consecuencia de todo lo expuesto, podemos señalar que cuando las plantas de judía evolucionan en presencia de distintas cantidades de potasio, manifiestan algunas diferencias en su composición, así como en la respuesta que elaboran

ran frente al ataque de Erwinia carotovora. Esta infección provoca alteraciones metabólicas que a su vez van influenciadas por las distintas concentraciones de potasio en los tejidos de Phaseolus vulgaris L. De esta forma, se obtienen distintos grados de susceptibilidad frente a la bacteria Erwinia carotovora e incluso se alcanza un estado de resistencia total a su infección en el que ningún síntoma de enfermedad se hace patente.

C. - RESPUESTA DE PHASEOLUS VULGARIS L.
EN RELACION A MODIFICACIONES EN SU
MEDIO DE CRECIMIENTO. INFLUENCIA
DEL $(NO_3)_2 Ca$.

El calcio es otro de los elementos base dentro de la nutrición vegetal ya que está ligado, intimamente, a procesos vitales de la planta como hemos indicado anteriormente.

Así, podemos señalar que la absorción de este elemento, en mayor o menor cantidad, por la planta, va a ser un factor determinante sobre el crecimiento de Phaseolus vulgaris L.

Las condiciones de deficiencia, de acuerdo a lo indicado por Hewitt (51) no parecen afectar ostensiblemente al crecimiento del vegetal, mientras que este elemento en exceso llega a

.../

causar una depresión en su desarrollo. Esto se explica fácilmente pues, como ya sabemos, el calcio es de suma importancia en la división y en la formación de la pared celular (150) e interviene, por tanto, directamente en la elongación. Algo similar fué expresado por Burström y Tullin (19) para otro tipo de plantas con distintas concentraciones de sal a las empleadas por nosotros. Según nuestros resultados, indicamos una concentración de $4 \times 10^{-3}M$ de $(NO_3)_2Ca$ como aquella capaz de producir un mejor crecimiento de Phaseolus vulgaris L.

a. Sensibilidad a la infección por
Erwinia carotovora.

En cuanto al ataque del parásito se refiere, aparece claramente como el calcio sigue manteniendo su efecto inhibitor sobre el desarrollo de Erwinia carotovora en su medio natural vegetal, así como en los cultivos in vitro en medio Smith, si bien en este, dicho efecto inhibitor se presenta para concentraciones de 2% de $(NO_3)_2Ca$, mientras que en la planta el desarrollo bacteriano no se detiene hasta alcanzarse un nivel de calcio de $8 \times 10^{-3}M$. Esto tiene una fácil explicación, ya que la bacteria encuentra en el medio vegetal diversas sustancias que también van a intervenir en su proliferación a la vez que utilizaran el calcio en diferentes formas, mitigando o simple

.../

mente retrasando su efecto inhibitor sobre Erwinia carotovora en la forma que se presenta cuando dicha bacteria se cultiva en medio sintético.

La intervención del calcio en la resistencia del tomate frente al ataque de Fusarium es un hecho señalado por Corden y Edginton (27). Asimismo, Weinberg (145) ha considerado el papel clave que desempeña el calcio en los mecanismos de defensa antimicrobianos de la planta.

b. Absorción de potasio, calcio y magnesio.

El análisis de cationes que hemos realizado en el tejido vegetal nos muestra la existencia de una proporción entre el calcio que aportamos en la solución de riego y la concentración de este elemento en los tejidos de la planta. Asimismo, es de señalar que mientras el magnesio mantiene prácticamente constante su concentración en la planta, el contenido de potasio disminuye conforme el aumento progresivo de calcio. Russell (106) había señalado ya una acción conjugada de ambos elementos en forma similar a lo que acabamos de expresar.

c. Contenido en compuestos carbonados.

Si fijamos nuestra atención en los compuestos carbonados de

la planta vemos como en sus tejidos tanto sanos como enfermos se han determinado o azúcares libres distintos, lactosa, sacarosa, galactosa, glucosa, levulosa y xilosa, si bien su contenido cuantitativo varía. Así tenemos que el calcio interviene en la translocación y acumulación de azúcares y, por ello, no es de extrañar que para el nivel más bajo de calcio se de una mayor cantidad de azúcares libres en detrimento de las sustancias reductoras, si bien éstas no se ven tan directamente influenciadas por dicho catión a altas concentraciones. Debemos señalar aquí las experiencias de Joham (61) que indica como afecta notablemente la deficiencia de calcio en la distribución de carbohidratos en la planta, lo cual venimos a confirmar con nuestros resultados. Paralelamente, la infección de Phaseolus vulgaris por Erwinia carotovora lleva a un descenso en el contenido de azúcares, en forma inversa a la concentración de calcio en cada planta. Según esto, podemos suponer que la invasión bacteriana produce una movilización de azúcares bien en orden a la nutrición de la propia bacteria, o bien en orden a la formación de un mecanismo de defensa, lo cual parece evidente dada la importancia que se ha atribuido a los azúcares en la resistencia de la planta a la infección. Incluso

.../

Horsfall y Dimond (53) han llegado a clasificar ciertas especies vegetales en susceptibles o resistentes según el contenido en azúcares de sus tejidos.

Las sustancias reductoras, sin embargo, no parecen estar implicadas tan directamente en la respuesta de la planta al ataque del patógeno, por lo que las variaciones que tienen lugar en ellas cuando se produce la infección son prácticamente insignificantes.

No ocurre lo mismo con las sustancias pécticas, ya que prácticamente el calcio juega un papel determinante en este sentido.

Además de reaccionar con ellas para formar pectatos insolubles, es el principal responsable de las uniones entre cadenas pécticas y proteínas (44) que se producen en la organización de la pared celular. Dicho complejo pécticas-catión metálico-proteína, parece estar directamente implicado en el proceso de resistencia vegetal según han indicado Wallace et al. (140).

Nosotros hemos comprobado como para una concentración de calcio en el medio de $2 \times 10^{-3}M$ le corresponde un óptimo en el contenido péctico, mientras que al incrementarse dicha concentración el nivel de sustancias pécticas desciende. Este re

.../

sultado corresponde claramente con lo que acabamos de decir ya que al encontrarse el calcio en mayor cantidad en el medio, se favorece la formación de complejos del tipo mencionado de alto poder cementante por la fuerza de las uniones entre ellos, con lo cual las sustancias pécticas no pueden ser determinadas como tales y quedan integradas en la estructura de estos compuestos mucho más complejos.

El gran aumento de material péctico que encontramos en los tejidos de la planta infectados por Erwinia carotovora, se debe a que esta bacteria, al penetrar en el huésped, destruye las uniones pécticas catión metálico-proteína y, por tanto, la cementación celular, con lo que la estructura se disgrega y quedan libres numerosas sustancias pécticas en diferentes formas que Erwinia carotovora, por la acción de sus enzimas pécticas, reducirá a su expresión más sencilla de dímeros o monómeros de ácido galacturónico.

d. Contenido en compuestos nitrogenados.

Si consideramos ahora los compuestos nitrogenados existentes en la planta, podemos ver como entre ellos se realizan diferentes interconversiones relacionadas con el mecanismo de defensa de la planta.

El nitrógeno libre experimenta un notable ascenso en los tejidos enfermos respecto a los sanos, según cabría esperar de la alteración metabólica que produce la infección según las experiencias realizadas por Akanawa y Uritani (1). Sin embargo, este aumento se verifica en sentido contrario al aporte de calcio a los tejidos y no por que este catión intervenga directamente en su acumulación, como ocurría en el caso del potasio, sino porque el incremento de calcio coincide con una mayor resistencia de Phaseolus vulgaris a la infección, por tanto, el grado de alteraciones metabólicas es menor debido a la resistencia que se presenta en la planta. Además, la escasa diferencia que nos presentan los tejidos sanos en cuanto a su contenido en nitrógeno libre según la distinta concentración de calcio, hace que pensemos en que no se da una verdadera interrelación entre estos dos elementos, digna de tenerse en cuenta.

El estudio de los aminoácidos libres en los tejidos de plantas de judía antes y después de la infección por Erwinia carotovora, nos lleva a pensar en que, en alguna forma, el calcio debe intervenir en su metabolismo ya que se observa un claro descenso del total de aminoácidos respecto al incremento de calcio en el medio, si exceptuamos los casos de lisina y arginina en los que se obtiene un ligero aumento. Asimismo, Steinberg et al (122) encontraron una acumulación de aminoácidos, paralela a determinadas deficiencias

.../

cias minerales. Estos hechos en nuestro caso nos llevan a pensar en una intervención del calcio en el metabolismo de aminoácidos y en su incorporación a la síntesis proteica. Además, observamos como todos los aminoácidos, sin excepción, aparecen en mayor cantidad en los tejidos, una vez que estos han sido infectados por la bacteria, lo cual debe considerarse como una clara respuesta de defensa frente al microorganismo, sobre todo si consideramos que también en el caso de los tejidos enfermos el incremento en la concentración de aminoácidos es inverso respecto al nivel de calcio en el medio, pues hemos visto, que al aumentar el contenido de este catión se llega a una resistencia total de la planta frente al parásito y la acumulación de aminoácidos disminuye. Solo el ácido aspártico y la prolina presentan una relación directa con el nivel de calcio en los tejidos infectados. Esto podría indicar que el metabolismo de ambos aminoácidos está más directamente influenciado por este catión y que además pueden desempeñar un papel más activo en la respuesta de la planta frente a la infección bacteriana.

De forma similar a lo que ocurría para el nitrógeno libre, el contenido proteico en el tejido de plantas de judía, ofrece

.../

muy pequeñas variaciones con relación a la cantidad de calcio existente en el medio donde se cultivan, si bien puede estar favorecido ligeramente por dicho elemento. En realidad, nunca se ha mencionado una intervención de este catión en el metabolismo proteico, excepto lo indicado por Ginzburg (44) que limita la acción del calcio, en relación con las proteínas vegetales, a servir de puente de unión entre estas y las sustancias pécticas de la lámina media. En plantas enfermas, también se manifiesta cierto paralelismo entre el contenido en nitrógeno libre y el correspondiente a proteínas que, de igual forma, presentan un incremento sustancial en los tejidos infectados respecto a los no infectados, sin embargo experimentan un descenso progresivo conforme aumenta el contenido en calcio desde un nivel de $2 \times 10^{-3}M$ en el medio. Como ya sabemos, dicho aumento del catión es proporcional a la resistencia que exhibe Phaseolus vulgaris frente a la invasión por Erwinia carotovora. Esto nos lleva a afirmar la idea de Wood (15) según la cual las proteínas juegan un papel importantísimo en la resistencia vegetal. Así, las variedades más resistentes de un tipo de plantas al ataque de un patógeno son aquellas que tienen un bajo contenido en proteínas específicas, de forma

.../

que no puedan satisfacer las necesidades del mismo. Cuando la resistencia no está bien definida y el nivel proteico es medio, como ocurre en las plantas de judía, las circunstancias externas, como el tipo de nutrición, pueden originar cambios en la concentración de dichas proteínas y modificar así la resistencia de la planta a la infección, según se verifica en el caso del calcio respecto a la interacción Phaseolus vulgaris - Erwinia carotovora que es objeto de nuestro estudio.

e. Presencia de enzimas pécticas.

No podemos olvidar que la virulencia del parásito y los efectos que pueda ocasionar sobre el huésped están estrechamente ligados a la capacidad de síntesis enzimática de Erwinia carotovora, una vez que se ha introducido en el medio vegetal. Así, en los estudios enzimáticos que hemos realizado sobre tejidos de plantas no infectadas inoculadas, no se encuentra prácticamente ninguna actividad en lo que respecta a las enzimas PG y PTE, mientras que sí aparece para la enzima PATE, aunque en muy pequeñas proporciones si lo comparamos con el elevado % de actividad enzimática que encontramos para esta enzima en tejidos enfermos de judía.

Los valores de síntesis enzimática PATE en plantas inoculadas con Erwinia carotovora alcanzan grados significativamente su

periores a los que se obtienen para la enzima PTE en iguales circunstancias, la cual continua sin manifestarse en plantas inoculadas que corresponden a una concentración de calcio de $15 \times 10^{-3}M$ que a pesar de haber sido inoculada de igual forma que los lotes restantes, no manifiesta ningún síntoma de enfermedad. Por tanto, parece evidente relacionar la resistencia exhibida por la planta con la incapacidad de síntesis de PTE por la bacteria en la concentración de calcio indicada de forma similar a lo expresado por Moore y Couch (84) en su trabajo sobre la actividad de la enzima PTE de *Pythium ultimum* respecto a la concentración de iones calcio en los tejidos de la planta.

Por otro lado, la enzima PG muestra valores hasta tres veces superiores en plantas infectadas y crecidas en concentraciones de calcio en el medio inferiores a $2 \times 10^{-3}M$, en relación a aquellas que se han desarrollado en un medio con cantidades de calcio superiores a este valor. Según esto, se manifiesta una clara inhibición de la enzima PG por los iones calcio, así como su importancia en el establecimiento de la enfermedad bacteriana ya que, según hemos señalado antes, esta enzima no aparece en tejidos sanos, de acuerdo con Hancock y Millar (48), sin embargo en tejidos enfermos con carencia de calcio alcanza valores de

.../

hasta un 60% de actividad. Con lo cual podemos decir que la enzima PG es una de las causas principales de la destrucción de la planta por Erwinia carotovora pero, a la vez, su acción se ve fuertemente inhibida por la presencia de iones calcio. Como indica Bateman (8) en un estudio de esta enzima producida por Rhizetonia en plantas de judía, lo que nos indica el importante influjo de este elemento en la resistencia de Phaseolus vulgaris.

También hay que resaltar el hecho de que para el valor medio que corresponde a una concentración de calcio de $4 \times 10^{-3} M$ se obtienen los valores máximos de síntesis enzimática para las dos enzimas transeliminativas PATE y PTE, mientras que la enzima hidrolítica PG experimenta un notable descenso. Esto podría indicarnos el nivel de calcio que favorece la aparición de estas enzimas en detrimento de PG, debido probablemente a sus diferentes mecanismos de acción. En este sentido, tenemos que recordar los trabajos de Ayers et al (6) y Turner y Bateman (132) que señalan como para determinados valores de calcio se produce una actividad de enzimas transeliminativas y una inhibición de PG. Starr y Moran (118) presentan un efecto similar de la acción de calcio en concentraciones próximas a $10^{-3} M$

.../

sobre la actividad de PATE Y PTE; y Papavizas y Ayers (92) expresan como la producción de PATE por Pusarium oxysporum se ve afectada por iones calcio, pero sin presentar una dependencia absoluta.

Para terminar con el estudio de este elemento queremos hacer hincapié en la notable influencia que este catión ejerce sobre el metabolismo y la fisiología de Phaseolus vulgaris, así como, y muy particularmente, en su intervención directa y eficaz en la resistencia que desarrolla la planta frente al ataque de Erwinia carotovora, de forma que para concentraciones superiores a $8 \times 10^{-3}M$ de calcio en el medio, el patógeno no progresa en su ataque de los tejidos vegetales y la enfermedad no se manifiesta.

**D. - RESPUESTA DE PHASEOLUS VULGARIS
A MODIFICACIONES EN SU MEDIO DE
CRECIMIENTO. INFLUENCIA DEL SO_4Mg .**

El magnesio ha sido señalado en un amplio trabajo (56) como uno de los elementos más importantes para el desarrollo normal de la planta. Sin embargo, nuestros estudios con este elemento, sobre su influencia en el crecimiento de Phaseolus vulgaris, nos ha indicado que el magnesio, aparentemente, no está implicado en este proceso, ya que como se puede ver en la Fig. 54, todas las plantas alcanzan altura y desarrollo semejantes, sin que tampoco aparezcan diferencias notorias en su consistencia, independientemente de la concentración de magnesio con la que hayan sido tratadas.

**a. Sensibilidad a la infección por
Erwinia carotovora.**

Al referirnos a la respuesta de Phaseolus vulgaris ante la infección bacteriana, tenemos que expresarnos en términos semejantes a los anteriores para el crecimiento. Tampoco aquí el nivel de magnesio influye en absoluto, de forma que todas las plantas de judía se muestran altamente susceptibles al ser atacadas por Erwinia carotovora. Esto no corresponde con lo dicho por Castano y Kerkamp (22) de que las plantas deficientes en magnesio son más susceptibles a la infección por Rhizoctonia solani. Sin embargo, Deverall y Wood (31), que en un principio sostenían esta misma idea, han llegado a

.../

la conclusión, por medios estadísticos, de que las diferencias de susceptibilidad de una planta, motivadas por el contenido en magnesio, no son en ningún modo significativas, con lo que concuerdan perfectamente nuestros resultados.

b. Absorción de potasio, calcio y magnesio.

La similitud que hemos indicado en el comportamiento externo de las plantas también viene explicada por los resultados que hemos obtenido respecto a la absorción de magnesio y su incorporación a los tejidos. La concentración de este elemento en el vegetal experimenta un ascenso proporcional a su contenido en el medio, pero en una forma tan discreta que no puede considerarse eficaz. Sin embargo, lo que sí es de destacar es la forma en que se altera la absorción de potasio y calcio, sobre todo para concentraciones de $2 \times 10^{-3}M$ en que se produce un considerable aumento de calcio en detrimento de la asimilación de potasio y para $4 \times 10^{-3}M$ de SO_4Mg en el medio en que ocurre el mismo fenómeno pero en sentido contrario. Estos resultados están de acuerdo con la idea expresada por Loustalet et al (77) de que tanto el calcio como el magnesio tienden a tener una correlación negativa con el nivel de potasio en el interior del tejido vegetal.

.../

c. Contenido en compuestos carbonados.

Los métodos cromatográficos nos indican como el contenido en azúcares libres del tejido vegetal aumenta al sufrir esta la infección bacteriana, la excepción que se nos presenta referente a la glucosa puede ser debida a la acción específica que el magnesio ejerce sobre la oxidación y acumulación de este azúcar a nivel celular, según un reciente trabajo realizado por Walker y Durham (138). Asimismo, hemos obtenido un ligero aumento de sustancias reductoras en razón directa al incremento de magnesio en el medio. Sin embargo, el contenido en dichas sustancias experimenta un notable descenso cuando se realizan los análisis correspondientes a partir de tejidos enfermos, si bien queda un poco atenuado para altas concentraciones de magnesio en el medio. Inman (55) también en plantas de judía, pero atacadas por hongos, llegó a resultados semejantes a los que acabamos de exponer. Así, podemos decir que mientras la concentración de azúcares libres aumenta con la infección bacteriana, las sustancias reductoras disminuyen paralelamente al incremento de dicha infección.

En cuanto al metabolismo de sustancias pécticas no se puede decir que la concentración de magnesio influya en forma significativa ya que lo mismo en tejidos sanos que en enfermos, el

nivel de estos compuestos se mantiene practicamente constante, con ligerísimas variaciones en plantas infectadas, independientemente del contenido en magnesio del medio. La única alteración que se produce en estas sustancias es la notable disminución que experimentan como consecuencia de la infección producida por Erwinia carotovora, lo cual es consecuencia lógica al actuar sobre ellas las enzimas pécticas que secreta esta bacteria, hecho que ha sido estudiado por Starr y Chatterjee (119). Sin embargo Corden (26) ha indicado que la hidrólisis de sustancias pécticas es estimulada por el magnesio, lo que no podemos admitir en nuestro caso, según los resultados obtenidos.

d. Contenido en compuestos nitrogenados.

Los resultados que hemos obtenido tanto en lo referente a contenido en nitrógeno libre como de sustancias proteicas en plantas sanas, señalan que el nivel que alcanzan estas en los tejidos del vegetal no se ve en ninguna forma influido por las diferentes concentraciones de magnesio en el medio, ya que a pesar de ellas, se mantienen practicamente constantes en la planta.

Cuando Phaseolus vulgaris se ve afectada por el ataque de

.../

Erwinia carotovora se produce un aumento considerable en el nivel proteico respecto a la planta sana, sin que tampoco le afecte para nada la cantidad de magnesio en el medio. Asimismo, tambien experimenta un pequeño ascenso el contenido en nitrógeno libre, si bien en distinta forma para las distintas molaridades de magnesio sin que se pueda encontrar una razón lógica que lo explique, aunque, muy probablemente, este efecto esté relacionado con el metabolismo de aminoácidos en el cual hemos podido comprobar que el magnesio sí actúa ampliamente. Así tenemos que en forma similar a las experiencias de Mulder y Bakema (86) en patata, la deficiencia de magnesio lleva consigo un aumento de treonina, alanina, leucina, isoleucina y fenilalanina, mientras que los demás aminoácidos disminuyen. Es curioso observar como en estas mismas plantas deficientes, al ser infectadas por la bacteria, se produce un aumento general en el contenido de aminoácidos mientras que para las concentraciones restantes de este elemento, dicho contenido disminuye en los tejidos enfermos respecto a los sanos. Estas diferencias pueden tener una clara explicación si hacemos referencia a las distintas y rápidas interconversiones aminoácidos-proteínas a que da lugar

.../

la infección microbiana según ha señalado Uritani (134).

Es de notar que el nivel general de aminoácidos más bajo se da para la concentración de SO_4Mg en el medio de $4 \times 10^{-3}\text{M}$, lo cual podría indicarnos la molaridad óptima de este elemento en lo que se refiere a su acción sobre el metabolismo de aminoácidos ya que según Webster (144), el magnesio interviene en la movilización de aminoácidos y, por tanto, en su incorporación a la síntesis de proteínas.

La aparición esporádica de prolina en alguna de las muestras no creemos que sea significativa, sino que más probablemente será debida a la interconversión metabólica que se da circunstancialmente entre dicho aminoácido y el ácido glutámico, como han demostrado Johnson y Strecker (62).

Como resumen diremos que la acción del magnesio sobre el nitrógeno y sus compuestos, proteínas y aminoácidos, solo se manifiesta, y en forma muy variada, sobre estos últimos, sin que se le pueda atribuir ningún papel directo en la resistencia de la planta.

e. Presencia de enzimas pécticas.

En plantas sanas no se ha encontrado el más leve indicio de

la enzima PG, mientras que sí se han encontrado aunque a un nivel reducido, cantidades crecientes de PATE Y PTE en orden al aumento de la concentración de ión magnesio en el medio.

En los tejidos enfermos la actividad PG llega a alcanzar un 30% aproximadamente para el valor máximo de magnesio ($15 \times 10^{-3}M$) ya que experimenta un aumento progresivo al de este elemento en el medio, pero en forma muy atenuada, por lo que no parece que este catión influya directamente sobre esta enzima y, por lo tanto, tampoco intervendrá eficazmente en la reducción de la maceración de los tejidos en forma parecida a lo expresado por Bateman y Lumsden (10) ya que parece ser que PG es la primera responsable de este proceso.

En cuanto a las enzimas PATE y PTE podemos decir que al igual que en las plantas sanas, ambas presentan un comportamiento muy similar en tejidos enfermos, alcanzando los máximos valores en los estadios máximo y mínimo de concentración de magnesio ($15 \times 10^{-3}M$ y 0) mientras que para valores intermedios de este elemento en el medio, las enzimas transeliminativas se podría decir que sufren cierta inhibición.

.../

Estos resultados se corresponden con los obtenidos por Millar (31) sobre la producción de PATE por Fusarium sp. en alfalfa y también con cierta parte de los presentados por Edstrom y Phaff (36) en el caso de la PTE secretada por Aspergillus fonsecaes.

No podemos olvidar aquí que estos resultados no coinciden, sin embargo, con los obtenidos "in vitro" ya que para concentraciones en el medio de un 4 a un 6%, el magnesio produce una inhibición total de las tres enzimas estudiadas. Lo que otra vez lleva a pensar en la protección y aporte de nutrientes que la bacteria encuentra en el medio vegetal y la complejidad de las reacciones metabólicas que se producen.

Según lo que acabamos de exponer, podemos decir que de acuerdo con la idea de que el magnesio participa activamente sobre la acción de diferentes enzimas, como puede ser el caso señalado por Cheng et al. (28) para la fosfatasa alcalina de Pseudomonas aeruginosa, su intervención se manifiesta en igual forma sobre las enzimas pépticas que hemos estudiado en este trabajo, si bien, dicha acción no llega a alcanzar la importancia que se atribuye a la desarrollada por otros

.../

caciones, por lo que tampoco podemos afirmar que juegue un papel decisivo respecto al desarrollo de la enfermedad causada por el ataque de la bacteria fitopatógena Erwinia carotovera en plantas de judía, Phaseolus vulgaris.

V. CONSIDERACIONES

V - CONSIDERACIONES

En los tres estudios que hemos desarrollado se ha pretendido conocer la importancia que pueden llegar a tener en el mecanismo infectivo tres elementos fundamentales de la nutrición vegetal: Potasio, calcio y magnesio.

A la vista de cuanto acabamos de exponer, cabe pensar que, indudablemente, el tipo de nutrición vegetal que puede constituir un factor decisivo en la relación huésped-parásito, si bien el mecanismo que decide su acción admite distintas variables.

En el caso del ensayo efectuado con NO_3K se ha visto la relación directa que existe entre la concentración de potasio en el

.../

medio y el absorbido por la planta, lo que, a su vez, va acompañado de un ligero aumento en proteína, incremento notable en sustancias reductoras y actividad enzimática muy regular. En estas condiciones solo enferman las plantas que disponen de las cantidades más bajas de NO_3K , lo que se puede justificar no solo por la acción inhibidora de este compuesto sobre el patógeno, sino además por el aumento que condiciona en compuestos carbonados que sabemos ejercen sobre cultivos in vitro de E. carotovora una acción de represión catabólica muy acusada.

En la experiencia a distintos niveles de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ se observa también una relación muy directa entre el calcio existente en el medio y el absorbido por la planta, acompañada de un ligero descenso en el contenido en potasio, lo que hace que quede postergada la intervención de este elemento por considerar de mayor interés los altos valores en calcio. En estas condiciones, la síntesis proteica en el vegetal es más alta que en el caso del potasio y el contenido en compuestos carbonados se mantiene dentro de valores muy uniformes. En estas condiciones podemos deducir que la resistencia a Erwinia carotovora que coincide con los altos niveles de calcio, no puede atribuirse a la presencia de hidratos de carbono, al no variar

.../

significativamente su proporción, debiendo estar más bien vinculado a los altos valores en calcio, que no solo inhiben la actividad de la enzima PG, sino que a grandes concentraciones lo hacen también en las enzimas transeliminativas, a las que solo favorece a dosis mucho más bajas.

En cuanto a las sugerencias que nos proporciona la experiencia con magnesio, comensaremos diciendo que su contenido en el tejido vegetal, siempre en baja proporción, es independiente de la riqueza en el suelo y su intervención en la movilización de otros elementos puede considerarse inexistente. Sin duda, estas plantas son las de más intensa síntesis proteica, entre las que hemos estudiado, y también su contenido en hidratos de carbono alcanza valores elevados. Pese a ello, hemos visto como enfermaban todas las plantas después de inoculadas con Erwinia carotovora sin que los datos obtenidos de los análisis vegetales y de su actividad enzimática nos hayan revelado ningún detalle específico que justifique esta respuesta.

Ante tales circunstancias, nos atrevemos a sugerir una interpretación que con todas sus reservas, creemos puede ser

.../

confirmada disponiendo de algunos medios y facilidades de los que carecemos en este momento. Se trata de realzar la importancia que tiene en la patogénesis de la bacteria sus alteraciones metabólicas que conducen a una morfología anormal de tipo globoide muy alejada, por lo tanto, de la forma coco-bacilar que es típica de E. carotovora. En nuestras experiencias estas formas anormales han perdido su capacidad para sintetizar enzimas pectolíticas y si admitimos que a la síntesis de estas enzimas está vinculada la capacidad de proliferación bacteriana en el huésped, hemos de suponer que la inducción de tales formas anormales inducidas por concentraciones altas de potasio y calcio, puede constituir uno de los medios de defensa del huésped frente al ataque de la bacteria.

Ahora bien, siendo el magnesio el elemento que, pese a ser incorporado en altas concentraciones en el medio donde crece E. carotovora, no altera su morfología ni decide la aparición de formas globoides anormales, no puede en consecuencia disponer de este instrumento de defensa que podría llegar a ser un determinante valioso en su reacción de protección

.../

frente al ataque de la bacteria.

En todos nuestros comentarios nos hemos cuidado muy bien de no dar prioridad a ninguna de las interpretaciones que son posibles para justificar los resultados de la reacción huésped-parásito. La causa estriba en que el sustrato que se proporciona a la bacteria E. carotovora es un ser viviente en el que los cambios que se van sucediendo no permiten, en la mayor parte de los casos, vincular observaciones determinadas a datos concretos ante la variabilidad de los mismos y sus interrelaciones.

No obstante, creemos haber presentado datos suficientes para abogar en favor de la idea que aspira a conseguir una protección del vegetal frente a algunos agentes microbianos, proporcionándole mediante los fertilizantes adecuados, una nutrición equilibrada que le permita desencadenar la reacción de defensa más conveniente.

.../

VI. CONCLUSIONES

VI - CONCLUSIONES

19. - Se ha confirmado la idea que atribuye un papel primordial a las características químicas del tejido vegetal en la propagación de enfermedades bacterianas.
29. - Los tres elementos que se estudian: potasio, calcio y magnesio, como variantes en la nutrición vegetal, pueden dar lugar a una serie de modificaciones en los componentes vegetales que proporcionan una variedad de hábitats biológicos a la bacteria fitopatógena que estudiamos.
39. - Estas modificaciones afectan al contenido en hidratos de carbono en la planta, con oscilaciones notables provo

.../

cadras por el potasio; a la síntesis proteica que alcan-
za los valores más altos en los medios de elevado con-
tenido en magnesio; a azúcares y aminoácidos libres;
así como a la producción de enzimas pécticas de acción
directa en los procesos de maduración y patogenicidad
vegetal.

49. - La bacteria Erwinia carotovora es capaz de sintetizar
enzimas pectolíticas, inducibles a las que hemos visto
está vinculado su carácter fitopatógeno.
59. - La presencia en el medio de cultivo normal para Erwinia
carotovora de concentraciones elevadas de NO_3K , ó
 $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ ó SO_4Mg disminuyen notablemente su produc-
ción celular y su síntesis enzimática, a la vez que los
dos primeros compuestos deciden la aparición de for-
mas anormales, con aspecto filamentosos y globoide
que en nada recuerdan al coco-bacilo original.
69. - Plantas de Phaseolus vulgaris L. que disponen en su
medio de concentraciones elevadas de potasio y calcio
son capaces de resistir al ataque de la bacteria Erwinia
carotovora en tanto que las concentraciones análogas
de magnesio no deciden ninguna acción protectora.

.../

79. - La resistencia que se ofrece en el caso del potasio se ha pretendido interpretar relacionando la intervención de este elemento con el contenido en sustancias carbonadas en el tejido vegetal, además de la acción directa de inhibición que ejerce el potasio sobre la bacteria E. carotovora. Sabemos que esta bacteria asimila rápidamente los compuestos de carbono pero también que estos compuestos a elevadas concentraciones originan una represión catabólica sobre las enzimas pécticas sintetizadas por la bacteria. La conjunción de ambas acciones puede justificar los resultados obtenidos.

89. - La acción del calcio en la relación huésped-parásito está asimismo vinculada a la dosis en que actúa puesto que si bien es cierto que estimula la acción de las enzimas transeliminativas, cuando su dosis es excesiva, ocasiona por el contrario una clara inhibición de las mismas, lo que sin duda ha de interferir en el proceso de degradación del tejido vegetal. Esta acción, junto a la ejercida directamente sobre Erwinia carotovora, puede justificar la defensa que aparece en el vegetal cuando se desarrolla en medios con abundante calcio.

.../

99. - En las experiencias que se centran sobre el magnesio no se dan las circunstancias descritas en los dos puntos anteriores. Es, por otra parte, el elemento mejor tolerado por E. carotovora, incluso a dosis muy elevadas, siendo ademas incapaz de inducir en la bacteria formas irregulares de escasa o nula patogenicidad como hemos presenciado lo hacen los otros elementos ensayados. Por ello, debemos admitir la idea de que el magnesio no condiciona en el vegetal estados de resistencia frente a sus posibles patógenos y, en consecuencia, estos vegetales llegan a ser facilmente invadidos por infecciones bacterianas.

109. - De cuanto queda expuesto, facilmente se desprende que las plantas de Phaseolus vulgaris cuando reciben una misma densidad de inóculo de Erwinia carotovora pueden enfermar y ser totalmente destruidas, pueden tambien desarrollarse sin mostrar lesión alguna y pueden, igualmente, ofrecer respuestas intermedias entre las dos apuntadas.

119. - Si tenemos en cuenta que estas plantas, pertenecientes

.../

a una misma variedad, se han desarrollado en idénticas condiciones de temperatura, humedad, aireación y luz, han alcanzado la misma edad, y han crecido en un único medio en el que solo imponemos una variante, no es arriesgado suponer que dicha variante puede ser responsable de una serie de condicionamientos que deciden las diversas respuestas observadas frente a una misma infección.

129. - Del conocimiento de un microorganismo fitopatógeno y de las condiciones en que crece su posible huésped, puede llegar a inferirse la reacción que se va a producir en el momento en que establezcan contacto.

130. - Creemos puede admitirse la posibilidad de convertir al posible huésped, mediante la adición de determinados nutrientes al suelo, en un medio desfavorable al desarrollo del microorganismo, que al no poder evolucionar dentro de los tejidos vegetales, no llega a manifestar su carácter patógeno, con lo que la planta queda protegida de la enfermedad.

.../

VII. RESUMEN

VII - RESUMEN

La idea básica de patogeneidad supone que el parásito ha de proliferar a expensas del tejido vegetal en el que se localiza, el cual a su vez sufre alteraciones que dan lugar a la aparición de síntomas externos reveladores de la enfermedad, en cuyo caso se pueda designar al microorganismo causante como patógeno. En consecuencia, si el parásito no evoluciona hay que concluir que es avirulento, que el huésped es resistente, o que concurren ambas circunstancias.

En el presente trabajo hemos querido estudiar los factores

.../

1077
inherentes a un microorganismo, Erwinia carotovora, que pueden decidir su carácter patógeno; así como las características que concurren en un huésped, Phaseolus vulgaris L. para que muestre resistencia o susceptibilidad a esta bacteria.

Puesto que el huésped pasa a constituir el medio de que dispone para su desarrollo el posible patógeno, es lógico que se conceda gran interés a la composición química de sus tejidos y estando esta en dependencia del suelo en que vive, se han relacionado los tres medios fundamentales que son: suelo: planta: bacteria, con el fin de justificar la aparición de enfermedades en el vegetal, por una parte, e intentar algún medio químico que permita su protección y defensa, por otra.

Entre los principales nutrientes vegetales han sido seleccionados para este estudio los tres que consideramos más esenciales que son potasio, calcio y magnesio. Las plántulas que obtenemos de semillas desinfectadas de judía, se desarrollan en un soporte de arena que recibe un conjunto equilibrado de nutrientes en el que se hace variar la concentración de cada uno de los elementos que hemos indicado. En estas condiciones, se observa como evoluciona el vegetal, se analizan quí-

.../

micamente sus tejidos y se comprueba si el patógeno, Erwinia carotovora, es capaz de invadirlos, o por el contrario, la planta se muestra resistente.

Las primeras observaciones centradas en la bacteria E. carotovora confirman que los elementos que hemos destacado intervienen en su metabolismo, dando lugar a manifestaciones muy concretas en cada caso. Todos ellos pueden interferir no solo en el tiempo de generación de la bacteria sino también en su capacidad de síntesis enzimática y, a veces, en su aspecto morfológico.

Los cambios que aparecen en su morfología son muy definidos y transforman el aspecto coco-bacilar en formas filamentosas y globoides, algunas de ellas con apariencia de paredes vacías y huecas, que son inducidas por NO_3K en concentraciones de 4 a 4,6% y de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ de 1,25 a 1,7%. En contraste con estas observaciones, la bacteria conserva su forma peculiar en presencia de SO_4Mg , incluso cuando su concentración alcance valores hasta de 10%.

De gran significación son las alteraciones que llegan a provocar los compuestos a los que nos estamos refiriendo, sobre la síntesis de enzimas pectolíticas, ya que estas enzimas tienen un papel relevante en la implantación de la enfermedad vegetal. En general,

.../

puede decirse que la enzima PG es casi totalmente anulada por 1% de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ y 3% de NO_3K ó SO_4Mg , al igual que ocurre con PATE para concentraciones de 3% SO_4Mg y 1,3 de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$, mientras que el NO_3K apenas afecta a esta enzima a las últimas concentraciones señaladas. Por otra parte, creemos interesante señalar que el NO_3K es el único de los componentes probados capaz de inhibir o estimular la síntesis de la enzima PTE por E. carotovora según actúe a concentraciones inferiores o superiores a 3,5% respectivamente. El efecto sobre esta enzima por parte de los otros elementos que estudiamos es de carácter inhibitor.

En cuanto a la influencia que los compuestos a que nos estamos refiriendo ejercen en el desarrollo de plantas de judía, hemos de significar que las concentraciones empleadas no ocasionan en los casos de potasio y magnesio ninguna alteración significativa en el aspecto externo, en tanto que el calcio produce una limitación en el desarrollo de la planta por encima de $8 \times 10^{-3}\text{M}$ de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ que también se observa en el medio carencial.

Independientemente de lo que revela el aspecto externo del vegetal, no hay duda de que su metabolismo experimenta cambios notables que pueden decidir su comportamiento cuando se inocu

.../

len con Erwinia carotovora. Así ocurre que, pese a su aspecto externo semejante, las plantas que crecen con cantidades distintas de potasio, enferman solamente cuando la concentración de NO_3K en el medio es inferior a $8 \times 10^{-3}\text{M}$. En el caso de SO_4Mg la enfermedad se extiende por igual en todas, con independencia de sus disponibilidades de magnesio. Y en cuanto a la presencia de calcio también se muestran resistentes a Erwinia carotovora, las plantas de judía que crecen en medios con concentraciones elevadas de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$, con independencia del desarrollo alcanzado.

No es solamente la presencia de cada uno de los elementos que estudiamos el factor responsable para que aparezca o no una enfermedad vegetal, puesto que existen además otros condicionantes que coadyuvan de manera especial en las relaciones huésped-parásito. Con el fin de conocer los cambios que implica en la fisiología del vegetal su habitat, en el que se encuentran los elementos que consideramos, hemos practicado una serie de análisis para que nos indiquen los principales componentes químicos de las plantas y poder así establecer conclusiones más precisas.

.../

Hemos de indicar, en primer lugar, que la asimilación que efectúa el vegetal de los elementos potasio, calcio y magnesio guarda relación directa con su contenido particular en el medio, si bien, la influencia de cada uno de ellos en la absorción de los demás se deja sentir de forma más amortiguada. Por ejemplo, en el caso de potasio su aumento modifica, dentro de valores limitados, la acumulación de calcio y magnesio por la planta. De igual forma, la mayor presencia en el medio de Ca y Mg influye solo ligeramente en la absorción de K-Ca respectivamente. En conclusión, las modificaciones que puedan experimentar las plantas que sometemos a los distintos tratamientos han de atribuirse de manera especial a dosis de cada elemento estudiado más que a las combinaciones entre ellos.

De todos los elementos ensayados es el potasio el que menos interviene en la síntesis de proteínas, estándole reservada la misión principal al magnesio que decide el mayor contenido proteico en aquellos vegetales que disponen de cantidades abundantes de SO_4Mg . Como factor común a todas las plantas que crecen en cualquiera de los regímenes minerales que hemos establecido, hay que admitir el notable incremento que experimenta

.../

su contenido proteico cuando sufren infecciones bacterianas.

Los aminoácidos libres que se observan en los tejidos vegetales puede decirse que son los mismos, independientemente de sus disponibilidades minerales, ya que las únicas diferencias significativas que se pueden apreciar son principalmente de tipo cuantitativo, e incluso en este aspecto no puede establecerse una relación precisa entre la presencia del aminoácido en el vegetal y el habitat en que crece.

Los análisis que se efectúan en los tejidos infectados por Erwinia carotovora revelan una movilización de aminoácidos por el microorganismo sin que nos sea posible decidir si las alteraciones observadas son el resultado o la causa del proceso patológico, puesto que en los datos obtenidos interviene la aportación del propio patógeno que además induce la formación de nuevas proteínas como reacción de defensa por parte del huésped.

Creemos que es interesante el comentario sobre las sustancias carbonadas que hemos analizado en los distintos vegetales, ya que indudablemente reflejan una influencia del habitat en que la planta crece. Así, los valores más altos corresponden a la experiencia en la que abunda el magnesio y se

.../

mantienen bastantes constantes en independencia de la dosis disponible de este elemento. Dentro de niveles inferiores, ocurre algo semejante para el Ca, mientras que es el K el elemento cuya concentración en el medio está más vinculada con la síntesis de estos compuestos por la planta, existiendo un valor entre $4 \text{ y } 8 \times 10^{-3} \text{ M}$ de NO_3K para el que se produce un incremento notable en los tejidos vegetales de estos compuestos, siendo de destacar que es precisamente en esta zona de alto contenido donde se indica el dintel de resistencia a la infección bacteriana que provocamos.

En cualquier caso, puede aceptarse que como consecuencia de la propagación de Erwinia carotovora en las plantas de judía inoculadas se produce una disminución notable de sus compuestos carbonados y observando los azúcares libres se ha visto por cromatografía la rápida desaparición de lactosa, sacarosa, galactosa, glucosa, levulosa y xilosa.

En cuanto a las sustancias pécticas se ha probado que su concentración en los tejidos de plantas sanas apenas experimenta variaciones en relación con la presencia de SO_4Mg y NO_3K , mientras que el $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ determina una disminución en estas sustancias a medida que el calcio va incrementándose en el medio de cultivo de la planta. Creemos significativo que una vez inoculadas estas

.../

plantas con Erwinia carotovora su contenido en pectina tiende a disminuir en la experiencia correspondiente a magnesio, en tanto que en el caso de calcio y potasio se presenta un incremento en estos compuestos pécticos que nos hace relacionar su intervención con la resistencia vegetal que hemos observado frente a la infección provocada por E. carotovora.

Parte principal en este estudio es la presencia de enzimas pécticas en el vegetal, gracias a las cuales puede seguir su evolución normal y llegar a la fase óptima de maduración. El tipo de estas enzimas, así como su mayor o menor actividad están vinculadas a los distintos estados de desarrollo que ordenadamente se van sucediendo en la fisiología vegetal. En la fase de prefloración, que es la considerada, no aparece en los tejidos vegetales la enzima poligalacturonasa, tanto en la experiencia que realizamos con NO_3K , como en los ensayos con $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ y SO_4Mg . En contraste, cuando estas mismas plantas enferman, la actividad de PG alcanza valores elevados, tanto en los estudios con NO_3K como con SO_4Mg , a la vez que estos altos valores bajan extraordinariamente cuando la presencia de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ excede concentraciones de $2 \times 10^{-3}\text{M}$, lo que sin duda viene a confirmar la acción inhibidora atribuida al calcio sobre la actividad de esta enzima.

.../

Respecto a las enzimas transeliminativas, cabe señalar que pectato-transeliminasa aparece en el tejido sano de las plantas sometidas a todos los tratamientos ensayados, si bien en el caso del tratamiento con NO_3K su actividad no varía con la concentración de potasio en el medio; en el tratamiento con SO_4Mg guarda relación directa con la concentración de magnesio y en el caso del tratamiento con $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ la actividad decrece para las concentraciones extremas y es más alta para el valor medio de $4 \times 10^{-3}\text{M}$ de sal cálcica. Una vez infectados estos mismo vegetales, la enzima PATE se mantiene prácticamente en el mismo valor en todas las plantas sometidas a tratamiento con NO_3K , por lo que hemos de suponer que en esta experiencia la degradación del ácido péctico que se produce, está vinculada simultáneamente a PATE y en mayor proporción a PG, a lo que coadyuva el pH del tejido enfermo. En el caso de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ la principal acción degradativa de los ácidos pécticos en la planta enferma está vinculada a la enzima PATE, que al contrario de lo que indicamos en el caso de PG, es activada por la presencia de iones cálcicos en el medio.

Finalmente, la destrucción de los ácidos pécticos en los tejidos de aquellas plantas que disponen de diferentes concentraciones

.../

de SO_4 Mg y han sido atacados por Erwinia carotovora debe efectuarse por acción conjunta de las enzimas PG y PATE, si bien esta última parece intervendría con más intensidad en los casos de concentraciones máxima y mínima de SO_4 Mg.

La otra enzima transeliminativa pectin-transeliminasa, no podemos afirmar si actúa sobre las pectinas antes o después de iniciarse la actividad de las restantes enzimas, y de acuerdo a nuestros resultados parece ser que su más eficaz intervención se produce en el experimento practicado con $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$.

Como resultado final hemos de decir que aparte de otros factores intrínsecos a los que ahora no nos referimos, existe una serie de condicionantes externos con los que es posible relacionar el carácter de resistencia o susceptibilidad que manifiestan las plantas de judía (Phaseolus vulgaris L.) cuando reciben una misma densidad de inóculo de Erwinia carotovora.

A la vista de todos estos resultados hemos llegado a sugerir distintas ideas que podrían interpretar alguno de los mecanismos de patogenicidad de la bacteria y conseguir medios de defensa para su huésped.

.../

VIII. BIBLIOGRAFIA

VI - BIBLIOGRAFIA

- 1.- **AKAZAWA, T. and URITANI, I. 1956. Respiratory increase and phosphorus and nitrogen metabolism in sweet potato infected with *Ceratocystis fimbriata*. J. - Biochem. 43, 579 - 87.**
- 2.- **ALBERSHEIM, P. 1969. Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes. Ann. Rev. Phytopath. 7, 171.**
- 3.- **ALBERSHEIM, P. and ANDERSON, A.J. 1971. Proteins from plant cell walls inhibit polygalacturonases secreted by plant pathogens. Nat. Acad. U.S. Proc. 68, 1815-1819.**

.../

- 4.- ALBERSHEIM, P. and KILLIAS, U. 1963. Histochemical
localisation at the electron microscope level.
Amer. J. Bot. 50, 732 - 45.
- 5.- ARNON, D.I. 1954. Criteria of essentiality of inorganic
micronutrients for plants. In "trace elements in
plant physiology" (T. Wallace, ed.) pp. 31 - 39
Chronica Botanica, Waltham, Massachusetts.
- 6.- AYERS, W.A., PAPAIVIZAS, G.C. and DIEM, A.P. 1966.
Polygalacturonate transeliminase and polygalacty
ronase production by *Rhizoctonia solani*. Phyto -
pathol. - 56, 1006 - 1011.
- 7.- BARTHOLEMEW, R.P. and JANSSEN, G. 1929. The relation
between concentrations of potassium in culture
solutions and optimum plant growth. Soil Sci. -
27, 189 - 203.
- 8.- BATEMAN, D.F. 1964. An induced mechanism of tissue
resistance to polygalacturonase in *Rhizoctonia*
infected hypocotyle of bean. Phytopathol. 54,
438 - 445.

.../

- 9.- BATEMAN, D.F. 1969. The enzymatic maceration of
plant tissue. *Netherlands J. Pl. Pathol.* 74 (suppl. 1)
67 - 80.
- 10.- BATEMAN, D.F. and LUMSDEN, R.D. 1965. Relation of
calcium content and nature of the pectic substances
in bean hypocotyle of different ages to susceptibility
to an isolate of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol.* 55,
734 - 738.
- 11.- BATEMAN, D.F. and MILLAR, R.L. 1966. Pectic enzymes
in tissue degradation. *Ann. Rev. Phytopathol.* 4,
119 - 146.
- 12.- BEESON, K.C. 1941. Effect of fertilizers on plant composi-
tion. Nitrogen, phosphorus and potassium. U.S.
Dept. Agr. Mis. Pub. XVI p. 1.
- 13.- BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology. 6th ed.
Williams and Wilkins (Ed.) Baltimore. 1946.
- 14.- BIEHN, W.L. and DIMOND, A.E. 1971. Effect of pectin
source and sugars on polygalacturonase production
by *ceratocystis ulmi*. *Phytopathol.* 61, 745 - 746.

.../

- 15.- BILLING, E. and BAKER, L.A.E. 1963. Characteristics of *Erwinia* like organisms found in plant material. *J. appl. Bacteriol.* 26, 58 - 65.
- 16.- BRENNER, D.J. and FANNING, G.R. 1972. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of *Erwinia* and between *Erwinia* species and other *Enterobacteria*. *J. Bacteriol.* 110, 12 - 17.
- 17.- BRENNER, S. and HORNE, R.W. 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochem. Biophys. Acta* 34, 103 - 110.
- 18.- BROWN, S.A. and JONES, D.R. 1954. Uptake of radioactive carbon and phosphorus by paraffinized leaves. *Nature* 173, 768 - 769.
- 19.- BURSTRÖM, H. and TULLIN, V. 1957. Observations on chelates and root growth. *Physiol. Plantarum* 10, 406 - 417.
- 20.- BURRILL, T.J. 1872. *Trans. III. State Hort. Soc. n. s. 11*, 79 - 80.

.../

- 21.- BYRDE, R.J.W. and FIELDING, A.H. 1968. Pectin-methyl-transeliminase as the macerating factor of *Sclerotinia fructigena* and its significance in brown rot of apple. *J.Gen.Microbiol.* 52, 287 - 297.
- 22.- CASTANO, J.J. and KERNKAMP, M.F. 1956. The influence of certain plant nutrients on infection of soybeans by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol.* 46, 326 - 328.
- 23.- CLOWES, F.A.L. and JUNIPER, B.E. 1968. *Plant Cells Botanical monographs.* Ed.J.H.Burnett M.A.D. Phil. Blackwell Scientific Publications. England.
- 24.- COCHRANE, U.W. 1958. *Physiology of Fungi.* p. 524. Wiley N. Y.
- 25.- CODNER, R.C. 1971. Pectinolytic and cellulolytic enzymes in the microbial modification of plant tissues. *J.appl. Bacteriol.* 34, 147 - 160.
- 26.- CORDEN, M.E. 1965. Influence of calcium nutritium on *Fusarium* wilt of tomato and polygalacturonase activity. *Phytopathol.* 55, 222 - 224.

.../

- 27.- CORDEN, M.E. and EDGENTON, L.V. 1960. A calcium requirement for growth-regulator-induced resistance to *Fusarium* wilt of tomato. *Phytopath.* 50, 625-626.
- 28.- CHENG, K.J. INGRAM, J.M. and COSTERTON, J.W. 1970. Release of alkaline phosphate from cells of *Pseudomonas aeruginosa* by manipulation of cation concentration and of pH. *J. Bacteriol.* 104 - II, 748 - 753.
- 29.- DEAN, M. and WOOD, R.K.S. 1967. Cell wall degradation by a pectate trans-eliminase. *Nature* 214, 408 - 410.
- 30.- DEMAİN, A.L. and PHAFF, H.J. 1957. Recent advances in the enzymatic hydrolysis of pectic substances. *Wallertin Lad. Commun* 20, 119 - 140.
- 31.- DEVERALL, B.J. and WOOD, R.K.S. 1961. Chocolate spot of beans (*Vicia faba* L.) interactions between phenolase of host and pectin enzymes of the pathogen. *Ann. Apl. Biol.* 49, 473 - 487.

.../

32. - DINGLE, J., REID, W.W. and SOLOMONS, G.L. 1953.
The enzymic degradation of pectin and other
polysaccharides. II. Application of the cup plate
technique to the estimation of enzymes. J.Sci.Feed
and Agr. 4, 149 - 155.
33. - DYE, D.W. 1969. A Taxonomic study of the genus
Erwinia. IV. "Atypical" Erwinias. N.Z.Jl.Sci. 12,
833 - 839.
34. - EASWARAN, K.S.S. 1973. Physiology of resistance
to a bacterial disease in Sorghum. V. Nature of
nitrogen synthesis in Sorghum tissues. Phytopath.
Z. 76, 117 - 122.
35. - EATON, S.V. 1952. Effects of potassium deficiency on
growth and metabolism of sunflower plants. Botan.
Gas. 114, 165 - 180.
36. - EDSTROMT, R.D. and PHAFF, H.J. 1964. Purification
and certain properties of pectin-trans-eliminase
from *Aspergillus fumigatus*. J.Biol.Chem. 239,
2403 - 2408.

.../

- 37.- EPSTEIN, E. 1961. The essential role of calcium in selective cation transport by plant cells. *Plant Physiol.* 36, 437 - 444.
- 38.- EVANS, H.J. and SORGER, G.J. 1966. Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 17, 47 - 76.
- 39.- FREIBERG, S.R. and STEWARD, F.C. 1960. Physiological investigations on the banana plant III Factors which affect the nitrogen compounds of the leaves. *Ann. Botany* 24, 247 - 257.
- 40.- FRIEDMAN, B.A. and CEPONIS, M.J. 1964. Acid production by *Erwinia carotovora* in vivo as a factor in virulence. *Phytopathol.* 54, 237.
- 41.- GALLEPY, M.E. and WALKER, J.C. 1949. Plant nutrition in relation to disease development. V. Bacterial wilt of tomato. *Am. J. Botany* 36, 613-623.
- 42.- GARBER, E.D. 1960. The host as a growth medium. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 88, 1187 - 94.

.../

43.- GIBBS, A.J. NIXON, H.L. and WOODS, R.D. 1963.

Properties of purified preparations of lucerne
mosaic virus. *Virology*, 19, 441.

44.- GINZBURG, B.Z. 1961. Evidence for a protein-gel structure

cross-linked by metal cations in the intercellular
cement of plant tissue. *J. Exptl. Botany* 12, 85-107.

45.- GRAINGER, J. 1956. Host nutrition and attack by fungal

parasites. *Phytopathol.* 46, 445 - 456.

46.- GRULA, M.M. 1970. Cell size of *Erwinia* sp. as influenced

by composition of medium. *Can.J. Microbiol.*
16:1363 - 65.

47.- HALL, C.E., JAKUB, M.E. and SCHMITT, E.O. 1945. The

structure of certain muscle fibrille as revealed by
the use of electron stains. *J. Appl. Phys.* 16, 459.

48.- HANCOCK, J.G. and MILLAR, R.L. 1965. Relative

importance of polygalacturonate transeliminase and
other pectolytic enzymes in Southern anthracnose,
spring black stem and stemphylium leaf spot of alfalfa.
Phytopathol. 55, 346 - 355.

.../

- 49.- HEILBRUNN, L.U. 1956. The Dynamic of Living
lytoplasm. Academic Press. N.Y.
- 50.- HEITEFUSS, R., BUCHANAN-DAVIDSON, D.I.
STAHMANN, M.A. and WALKER, J.C. 1960.
Electrophoretic and immunochemical studies
of proteins in cabbage infected with *Fusarium*
oxysporum f. conglutinans. Phytopathol. 50,
198 - 205.
- 51.- HEWITT, E.J. 1963. The essential nutrient elements:
Requeriments and interactions in plants. Plant
Physiol. III, 137. Ed. F.C. Steward. Academic
Press. N.Y.
- 52.- HOAGLAND, D.R. and ARNON, D.I. 1950. The water
culture method for growing plants without soil.
California Agr. Experm. Station. V. 1. Circular 347
- 53.- HORSFALL, J.G. and DIMOND, A.E. 1957. Interactions
of tissue sugar, growth substances and disease
susceptibility. Sonder Z.f. Pflansenkrh.
Pflanzensch. 64, 415 - 421.

.../

54. - HUMPHRIES, E.C. 1956. Modern methods of plant analysis.
vol. 1 p. 468. Springer-Verlag. Berlin, Göttingen,
Heidelberg.
55. - INMAN, R.E. 1962. Disease development, disease in
tewrity and carbohydrate levels in rusted beans
plants. Phytopathol. 52, 1207 - 1211.
56. - JACOB, A. 1958. Magnesium, the fifth major plant nutrient.
Staples Press. London.
57. - JANSEN, E.F. and Mc DONNELL, L.R. 1945. Influence
of methoxyl content of pectic substances on the action
of polygalacturonase. Arch. Biochem. 8, 97-112.
58. - JANSEN, W.A. 1962. Botanical histochemistry. W.A.
Freeman Co., San Francisco p. 408.
59. - JANSENN, G. and BARTHOLEMEW, R.P. 1930. The
influence of the potash concentration in the culture
medium on the production of carbohydrate in plants.
J. Agr. Research. 40, 243 - 261.
60. - JOHAM, H.E. 1950. The calcium and potassium nutrition
of cotton as influenced by sodium. Plant Physiol.
30, 4 - 10.

.../

- 61.- JOHAM, H.E. 1957. Carbohydrate distribution as affected by calcium deficiency in cotton. *Plant Physiol.* 32, 113 - 117.
- 62.- JOHNSON, A.B. and STRECKER, H.J. 1962. The interconversion of glutamic acid and proline. *J. Biol.Chem.* 237, 1876 - 1881.
- 63.- JOHUSTONE, K.H. 1931. Observations on varietal resistance of the apple to scab (*Venturia inaequalis*) with special reference to its physiological aspects. *J. Pomol and Hort.Sci.* 9, 195 - 227.
- 64.- JONES, L.R. 1909. The bacterial soft rots of certain vegetables. II. Pectinase, the cytolytic enzyme produced by *Bacillus carotovorus* and certain other soft rot organisms. *Vt.Agr.Exp.Sta.Tech. Bull.* 147, 281 - 360.
- 65.- JONES, T.M., ANDERSON, A.J. and ALBERSHEIM, P. 1972. Host pathogen interactions. IV. Studies on the polysaccharide degrading enzymes secreted by *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. *Physiol. Plant. Pathol.* 2, 153 - 166.

.../

- 66.- KABU, K.L. and TOOP, E.W. 1970. Influence of potassium magnesium antagonism on tomato plant growth. Can.J.Plant Sci. 50, 711 - 715.
- 67.- KAMINSKA, M. 1973. The effect of apple tree proliferation disease on chlorophyll, free amino acids and amide contents in the leaves of infected trees. Phytopath. Z. 76, 142 - 148.
- 68.- KERN, H. 1956. Problems of incubation in plant diseases. Ann.Rev.Microbiol. 10, 351 - 368.
- 69.- KIRBY, K.S. 1957. A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids. Evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein. Biochem. J. 66, 495-504.
- 70.- KNÖSEL, D. and LANGE, E. 1971. The influence of pectolytic enzymes on bacterial infection of plant tissue. Proc.Int.Conf.Plant Path. Bacteria 345 - 350.
- 71.- KOMAGATA, K., TAMAGAWA, Y. and KOCUR, M. 1968. Differentiation of *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora* and *Erwinia herbicola*. J. Gen. Appl. Microbiol. 14, 39 - 45.

.../

- 72.- LAGERWERFF, J.V. and EAGLE, H.E. 1961. Osmotic and specific effects of excess salts on beans. Plant Physiol. 36, 472 - 477.
- 73.- LATO, M., BRUNELLI, B., CIUFFINI, G. and MEZZETTI, T. 1968. Analysis of carbohydrates in biological fluids by means of thin layer chromatography. J. Chromatog. 36 : 191 - 197.
- 74.- LAVOLLAY, J. 1953. Les oligo-éléments dans la nutrition et la croissance des microorganismes. VI^e Congr. Intern. Microbiol. Symposium, Roma LXII, n° 3-4, pp. 1 - 25.
- 75.- LAYNE, E. 1957. In methods in Enzymology. vol. 3. Ed. by Calowck, S.P. and Kaplan, N.O. Academic Press INC. N.Y.
- 76.- LAZAR, I. 1971. Serological relationships between "amylovora" "carotovora" and "herbicola" groups of the genus Erwinia p. 131. Sum.Int. Conf. Plant. Patho. Bact. 3rd. n° 15 and 36. Wageningen, Netherlands.

.../

77.- LOUSTALOT, A.J., GILBERT, S.G. and DROSDOFF, M.

1950. The effect of N and K leaves in tung seedling on growth, apparent photosynthesis and carbohydrate composition, Plant Physiol. 25, 394 - 412.

78.- MANGIN, L. 1893. Sur l'emploi de rouge de tuthenium en anatomie végétale. C. r. Hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris. 16, 653.

79.- MATTHEE, F.N. and DAINES, R.H. 1969. The influence of nutrition on susceptibility of peach foliage to water congestion and infection by Xanthomonas pruni. Phytopathol. 59, 285 - 287.

80.- Mc. COMBS, E.A. and Mc. CREADY, R.M. 1952. Colorimetric determination of pectic substances. Anal. Chem. 24 : 1630 - 1632.

81.- MILLAR, R.L. 1965. Polygalacturonate trans-eliminase production by Fusarium sp. isolated from alfalfa roots. Phytopathol. 55, 130.

82.- MOFFAT, E.D. and LYTLE, R. 1959. Polychromatic technique for the identification of aminoacids on paper chromatograms. Anal. Chem. 31:926-928.

.../

83.- MOORE, L.D., COUCH, H.B. and BLOOM, T.R. 1963.

Influence of environments on diseases of turfgrasses.

III Effect of nutrition, pH, soil temperature, air temperature and soil moisture on Pythium blight of Highland bentgrass. Phytopathol. 53, 53 - 57.

84.- MOORE, L.D. and COUCH, H.B. 1968. Influence of calcium

nutrition on pectolytic and cellulolytic enzyme activity of extracts of Highland Bentgrass foliage blighted by Pythium ultimum, Phytopathol. 58, 833 - 838.

85.- MOORE, S. and STEIN, W.H. 1948. Photometric ninhydrin

method for use in the chromatography of amino acids, J. Biol.Chem. 176, 367.

86.- MULDER, E.G. and BAKEMA, K. 1956. The effect of the

nitrogen, phosphorus, potassium and magnesium nutrition of potato plants on the content of free amino acids and on the amino composition of the protein of the tubers. Plant and Soil 10, 335 - 355.

.../

- 87.- NAIK, R. and POWELL, D. 1973. Changes in protein and isosyme content of apple fruit following infection by *Monochaetia mali*. *Phytopathol.* 63, 851 - 854.
- 88.- NASUNO, S. and STARR, M.P. 1967. Polygalacturonic acid transeliminase of *Xanthomonas campestris*. *Biochem. J.* 104, 178 - 185.
- 89.- NAYUDU, M.V. and WALKER, J.C. 1960. Bacterial spot of tomato as influenced by temperature and by age and nutrition of the host. *Phytopathol.* 50, 360 - 364.
- 90.- NGUYEN, S.T., PAQUIN, R., O'GRADY, L.J. et OUELLETTE, G.J. 1972. Influence de la fertilisation azotée, phosphatée et potassique sur l'incorporation des acides aminés aux protéines et les rendements de la luzerne. *Can. J. Plant. Sci.* 52, 41 - 52.
- 91.- NICHOLAS, D.J.D. 1963. Inorganic nutrition of microorganism. *Plant Physiology III*, 363 - 447.

.../

92. - PAPAIVIZAS, G.C. and AYERS, W.A. 1966.

Polygalacturonate transeliminase production
by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani*.
Phytopathol. 56, 1269 - 1273.

93. - PARKER, K.G., LUEPSCHEN, N.S. and FISHER, E.G.

1961. Tree nutrition and fire blight
development. Phytopathol. 51, 557 - 560.

94. - PATEL, P.N. and WALKER, J.C. 1963. Changes in

free amino acid and amide content of resistant
and susceptible beans after inoculation with
the halo blight organism. Phytopathol. 53,
522 - 528.

95. - PATIL, S.S. and DIMOND, A.E. 1968. Repression of

P.G. synthesis in *Fusarium oxysporum* f. sp.
lycopersici by sugars and its effect on symptom
reduction in infected tomato plants. Phytopathol.
58, 676 - 682.

96. - PEARSALL, W.H. and HANBY, A.M. 1925. The

variation in leaf form in *Petromegaton*
perfoliatus. New Phytologist. 24, 112 - 120.

.../

- 97.- PENSTON, N.L. 1931. Studies of the physiological importance of the mineral elements in plants III. A study by microchemical methods of the distribution of potassium in the potato plant. Ann. Bot. 45, 673 - 692.
- 98.- PEROMBELON, M.C.M. and LOWE, R. 1971. The effects of bile salts media and the age of inocula in quantitative studies of populations of *E. carotovora* var. *carotovora* and *E. carotovora* var. *atroseptica*. J. appl. Bacteriol. 34, 501.
99. PIPER, C.S. 1942. Soil and plant analysis. Adelaide. University of Adelaide. U.S.A.
- 100.- PRESTON, R.D. 1952. The molecular Architecture of Plant Cell Walls. London. Chapman & Hall.
- 101.- PROVASOLI, L. 1958. Nutrition and ecology of Protozoa and algal. Ann. Rev. Microbiol. 12, 279-308.
- 102.- RICHARDS, F.J. and BERNER, E. 1954. Physiological studies in plant nutrition XVII. A general survey of the free amino acids of barley as

.../

affected by mineral nutrition with special
reference to potassium supply. Ann. Botany, 18,
15 - 33.

- 103.- ROGERS, H. and PERKINS, H.R. 1968. Cell Wall and
Membranes. London : Spon.
- 104.- ROHRINGER, R., STAHMANN, M.A. and WALKER, J.C.
1958. Biochemical changes in plant disease:
Effect of *Fusarium oxysporum* f. by *copersici* and
its metabolites on leaf constituents of susceptible
and resistant tomatoes. J. Agr. and Food Chem. 6,
838 - 843.
- 105.- RUBENSTEIN, K.E., STREIBEL, E.S., MASSEY, S.,
LAPI, L. and COHEN, S.S. 1972. Polyamine
metabolism in potassium deficient bacteria. J.
Bacteriol. 112, 1213 - 1221.
- 106.- RUSSELL, E.J. 1954. Soil conditions and plant growth.
8th. Ed. Longmans, Green and Co. London.
- 107.- SHOOTER, R.A. and WYATT, H. 1955. Mineral
requirements for growth of *Staphylococcus pyogens*.

.../

Effect of magnesium and calcium ions. Brit.

J. Exptl. Pathol 36, 341 - 350.

108.- SMITH, L. 1963. Chromatographic and electrophoretic

techniques. Vol. I Edi. W. Heineman,

Medical Books.

109.- SMITH, W.K. 1958. A survey of the production of pectic

enzymes by plant pathogenic and other bacteria.

J. Gen. Microbiol. 18, 33 - 41.

110.- SOMOGYI, M. 1952. Notes on sugars determination.

Biol. Chem. 195 : 19 - 23.

111.- SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H. and MOORE, S. 1958.

Automatic recording apparatus for use in the

chromatography of amino acids. Anal. Chem.

30 : 1190 - 1206.

112.- SPALDING, D.H., WELLS, J.M. and ALLISON, D.W.

1973. Catabolite repression of P.G., pectic

lyase and cellulase synthesis in Penicillium

expansum. Phytopathol. 63, 840 - 844.

.../

113.- STADTMAN, E.R. 1970. The Enzymes I.p.419.

Edit. by Boyer, P.D.

114.- STAHL, E., BOLLIGER, H.R. and LEHNERT, L. 1961.

Vortrag über Dünnschicht-Chromatographie,

Symposium über Carotine und Carotinoide der

Dtsch. Ges. f. Ernährung in Mainz.

115.- STAPLES, R.C. and STAHMANN, M.A. 1964. Changes

in proteins and several enzymes in susceptible

bean leaves after infection by the bean rust

fungus. Phytopathol. 54, 760 - 764.

116.- STARR, M.P. and MANDEL, M. 1950. The nutrition

of phytopathogenic bacteria. IV. Minimal nutritive

requirements of the genus Erwinia. J. Bacteriol.

60, 669 - 672.

117.- STARR, M.P. and MANDEL, M. 1969. DNA base

composition and taxonomy of phytopathogenic and

other Enterobacteria. J. Gen. Microbiol. 56.

113 - 123.

.../

- 118.- STARR, M.P. and MORAN, F. 1962. Eliminative split of pectic substances by phytopathogenic soft rot bacteria. *Science* 135, 920 - 921.
- 119.- STARR, M.P. and CHATTERJEE, A.K. 1972. The genus *Erwinia*: Enterobacteria pathogenic to plants and animals. *Ann. Rev. Microbiol.* 26, 389 - 426.
- 120.- STEFFENSEN, D. 1955. Breakage of chromosomes in *Tradescantia* with a calcium deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 41, 155 - 160.
- 121.- STEFFENSEN, D. 1958. Chromosome aberration in calcium deficient *Tradescantia* produced by irradiation. *Nature* 182, 1750 - 1851.
- 122.- STEINBERG, R.A., BOWLING, J.D. and Mc. MURFREY, J.E. Jr. 1950. Accumulation of free amino acids as a chemical basis for morphological symptoms in tobacco manifesting frenching and mineral deficiency symptoms. *Plant Physiol.* 25, 279 - 288.

.../

- 123.- STERLING, C. 1970. Crystal structure of ruthenium red and stereochemistry of its pectic stain. Am. J. Bot. 57, 172.
- 124.- STEWARD, F.C. and BARBER, J.T. 1964. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 : 525 - 531.
- 125.- SWINBURNE, T.R. and CORDEN, M.E. 1969. A comparison of the polygalacturonase produced in vivo and in vitro by *Penicillium expansum* thom. J. Gen. Microbiol. 55 : 75 - 87.
- 126.- TEJERINA, G. 1969. Wirkung verschiedener Stickstoffquellen auf die Entwicklung und Polygalakturonaseproduktion von *Erwinia carotovora*. Zeitschrift Allg. Mikrobiologie. 9, 61 - 68.
- 127.- TEJERINA, G. y FERNANDEZ, P. 1966. Factores que afectan a la producción de enzimas pectolíticas. Anales de Bromatología XVIII, 371 - 384.
- 128.- TEJERINA, G. y SERRA, M.T. 1969. Respuesta de *Erwinia carotovora* a distintas fuentes de carbono. Microbiol. Españ. 22, 251.

.../

- 129.- TEJERINA, G. and SERRA, M.T. 1971. The effect of
sugars on the pathogenesis of *Erwinia carotovora*.
Phyton 28, 87 - 93.
- 130.- TSO, T.C. and Mc MURTREY, J.E. 1960. Mineral
deficiency and organic constituents in tobacco
plants. II. Amino acids. *Plant Physiol.* 35,
865 - 870.
- 131.- TUTTOBELLO, R. and MILL, P.J. 1961. The pectin
enzymes of *Aspergillus niger*. I The production
of active mixtures of pectic enzymes. *Biochem.*
J. 79, 51 - 57.
- 132.- TURNER, M.T. and BATEMAN, D.F. 1968. Maceration
of plant tissues susceptible and resistant to soft
rot pathogens by enzymes from compatible host-
pathogen combinations. *Phytopathol.* 58,
1509 - 1515.
- 133.- UNBEAUN, L.M. and MOORE, L.D. 1970. Pectic
enzymes associated with black root rot of
tobacco *Phytopathol.* 60, 304 - 308.

.../

134.- URITANI, I. 1971. Protein changes in diseased plants.

Ann. Rev. Phytopathol. 9, 211 - 234.

135.- VALLEE, B.L. 1962. Mineral Metabolism II, 443 - 51.

Comarc, C.L. and Bronner, F. Eds., Academic Press, N.Y.

136.- VOETS, J.P. et DELONNINCL, G. 1963. Rechercher sur

sur la nutrition d'Erwinia carotovora. Ann. Pasteur 105, 401 - 408.

137.- WAKKER, J.H. 1883. Vorläufige Mittheilungen über

Hyacinthenkrankheiten. Bot. Centbl. 14, 315-317.

138.- WALKER, C.A. and DURHAM, N.N. 1973. The role of

multivalent cations in the uptake and oxidation of glucose by *P. fluorescens*. Biochem. J. 136, 429-431

139.- WALDEE, E.L. 1945. Comparative studies of some peri

trichous phytopathogenic bacteria. Iowa State Coll. Sci. 19, 435 - 84.

140.- WALLACE, J. KUC, J. and DRAUDT, H.N. 1962.

Biochemical changes in the water-insoluble material of maturing apple fruit and their possible relationship to disease resistance. Phytopathol. 52, 1023 - 1027.

.../

- 141.- WATSON, M.L. 1958. Staining of tissue section for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4, 727.
- 142.- WEBB, M. 1949. The influence of magnesium on the growth and cell division of various bacterial species in complex media. *J. Gen. Microbiol.* 3, 410 - 417.
- 143.- WEBB, M. 1951. The influence of magnesium on cell division. The effect of mg. on the growth of bacteria in chemically defined media of varying complexity. *J. Gen. Microbiol.* 5, 485 - 495.
- 144.- WEBSTER, G.C. 1956. Effects of monovalent cations on the incorporation of amino acids into protein. *Biochem. Biophys. Acta.* 20, 565 - 566.
- 145.- WEINBERG, E.D. 1966. Roles of metallic ions in host-parasite interactions. *Bact. Rev.* 30, 136 - 151.
- 146.- WENHOLD, A.R., DODMAN, R.L. and BOWMAN, T. 1972. Influence of exogenous nutritions on virulence of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol.* 62, 278 - 281.

.../

- 147.- WIRINGA, K.T. 1947. A method for isolating and counting pectolytic microbes. IV. Int. Congr. Microbiol. 482 - 483.
- 148.- WILLIAMS, R.C. and WYCKOFF, R.W. 1945. Electron shadow micrographs of virus particles. Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y. 265.
- 149.- WINSLOW, C.G.H., BROADHURST, J. BUCHNAN, R.E., KRUMWIEDE Jr. C., ROGERS, L.A. and SMITH, G.H. 1917. The families and genera of the Bacteria. Preliminary report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterisation and Classification of bacterial types. J. Bact. 2, 505 - 566.
- 150.- WOOD, R.K.S. 1960. Pectic and cellulolytic enzymes in plant disease. Ann. Rev. Plant. Physiol. 11 299 - 322.
- 151.- WOOD, R.K.S. 1967. Physiological Plant Pathology. Ed. Kames, W.O. and Burnett. J.H. Phil. M.A.D. Blackwell Scientific Publications. Oxford and Edinburgh.

152.- WOOD, T.M. 1968. Cellulolytic enzyme system of *Trichoderma Koningii*. Separation of enzymes attacking native cotton. *Biochem. J.* 109. 217.

153.- ZUCKER, M. and HANKIN, L. 1970. Regulation of pectate lyase synthesis in *Pseudomonas fluorescens* and *Erwinia carotovora*. *J. Bacteriol.* 104. 13 - 18.